



Degradación de andamios hechos de polímeros biodegradables mediante electrohilado

ASTEGIANO, MARÍA EMILIA

Universidad Nacional de Rosario
Facultad de Ciencias Exactas, Ingeniería y Agrimensura
Escuela de Ingeniería Mecánica
Rosario, Argentina
18 de agosto de 2023

Degradación de andamios hechos de polímeros biodegradables mediante electrohilado

Astegiano, María Emilia

Proyecto Final de Ingeniería Mecánica presentado como requisito parcial para
optar al título de:
Ingeniera Mecánica

Directores:

Ing. Pedro Sismondi – Ing. Guillermo Rodríguez – Ing. Juan Sismondi

Universidad Nacional de Rosario
Facultad de Ciencias Exactas, Ingeniería y Agrimensura
Escuela de Ingeniería Mecánica
Rosario, Argentina
18 de agosto de 2023

Resumen

Los andamios hechos mediante electrohilado representan un enfoque prometedor dentro del campo interdisciplinar de la Ingeniería de Tejidos. Sirven de estructura artificial de soporte para el crecimiento celular, proporcionando el recrecimiento y la regeneración de los tejidos. Dado que los poliésteres alifáticos, como la Policaprolactona (PCL) y el Ácido Poliláctico (PLA), son susceptibles a la degradación hidrolítica y enzimática, pueden metabolizarse *in vivo* y eliminarse por vía renal, lo que explica su uso generalizado en aplicaciones biomédicas.

En este estudio, se analizará y comparará el comportamiento de degradación de andamios fibrosos sintetizados por electrohilado a partir de mezclas de PCL y PLA en diferentes entornos. El objetivo principal es analizar el efecto del PLA sobre las muestras poliméricas de PCL durante el período de degradación. Para el proceso hidrolítico, las muestras se exponen a agua destilada, fluidos corporales simulados modificados (m-SBF) y medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Además, la degradación enzimática se lleva a cabo mediante la Tripsina. Las muestras se caracterizan mediante distintas técnicas, como la microscopía electrónica de barrido (SEM) para analizar la morfología de los andamios, la calorimetría diferencial de barrido (DSC) para observar las propiedades térmicas y la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para examinar la composición química. También se determina la pérdida de masa.

Palabras clave: *Andamios - Polímeros biodegradables - Ingeniería de tejidos - Degradación hidrolítica - Degradación enzimática - Ácido Poliláctico - Policaprolactona*

Abstract

Electrospun scaffolds represent a promising approach within the interdisciplinary field of tissue engineering. They serve as an artificial support structure for cell growth, providing tissue regrowth and regeneration. Since aliphatic polyesters, such as polycaprolactone (PCL) and polylactic acid (PLA), are susceptible to hydrolytic and enzymatic degradation, they can be metabolised *in vivo* and eliminated renally, which is the reason for their widespread use in biomedical applications.

In this study, the degradation behaviour of fibrous scaffolds synthesised by electrospinning of PCL and PLA blends in different environments will be analysed and compared. The main objective is to analyse the effect of PLA on polymeric PCL samples during the degradation period. For hydrolytic degradation the samples are exposed to distilled water, modified simulated body fluids (m-SBF) and Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). In addition, enzymatic degradation is carried out by Trypsin. Samples are characterised using different techniques such as Scanning Electron Microscopy (SEM) to analyse the morphology of the scaffolds, Differential Scanning Calorimetry (DSC) to observe the thermal properties and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) to examine the chemical composition. Mass loss is also determined.

Keywords: *Electrospun scaffolds – Biodegradable polymers – Tissue engineering– Hydrolytic degradation – Enzymatic degradation – Polylactide acid - Polycaprolactone*

Índice

1. Introducción	1
2. Fundamentos teóricos	3
2.1. Materiales	4
2.1.1. Materiales poliméricos	4
2.1.2. Policaprolactona y Ácido Poliláctico	5
2.2. Dispositivos	7
2.2.1. Dispositivo de electrohilado o electrospinning	7
2.2.2. Dispositivos de caracterización	9
2.3. Degradación de polímeros	11
2.3.1. Soluciones para la degradación	12
2.4. Estado del arte	14
3. Métodos y Materiales	17
3.1. Preparación de las soluciones	17
3.2. Proceso de electrohilado	17
3.3. Preparación de las muestras	17
3.4. Preparación de los medios de degradación	18
3.5. Proceso de degradación	20
3.6. Proceso de caracterización	20
4. Resultados y discusión	23
4.1. Espectroscopio infrarrojo por transformada de fourier	23
4.2. Microscopio electrónico de barrido	26
4.3. Calorímetro diferencial de barrido	26
4.4. Cambios en la masa	32
5. Conclusiones	35
Apéndice	IX
A. Resultados FTIR	IX
B. Resultados SEM	XIII
C. Resultados DSC	XV
D. Resultados de los cambios en la masa	XX

Índice de figuras

2.1. Descripción esquemática de la estrategia de andamiaje para el tratamiento de defectos óseos [30].	4
2.2. Estructura química del PCL [20].	5
2.3. Estructura química del PLA [20].	6
2.4. Diagrama esquemático del montaje básico de electrohilado.	7
2.5. Sección transversal del chorro y fuerzas implicadas [34].	8
2.6. Ilustración esquemática de la trayectoria del chorro entre la punta de la jeringa y el colector [18].	8
2.7. Nomenclatura de la enzima.	14
4.1. Análisis de la estructura química de andamios de PCL 150mg/ml antes y después de la degradación por 12 semanas.	23
4.2. Análisis de la estructura química de andamios de PCL/PLA 100/50 mg/ml antes y después de la degradación por 12 semanas.	24
4.3. Análisis de la estructura química de andamios de PCL/PLA 75/75 mg/ml antes y después de la degradación por 12 semanas.	25
4.4. Análisis de la estructura química de andamios de PCL/PLA 50/100 mg/ml antes y después de la degradación por 12 semanas.	25
4.5. Resultados del DSC para el agua destilada.	27
4.6. Resultados del DSC para el DMEM.	28
4.7. Resultados del DSC para el m-SBF.	29
4.8. Resultados del DSC para la Tripsina.	30
4.9. Masa remanente.	32
4.10. Masa remanente.	33
B.1. PCL 150mg/ml en diferentes magnificaciones: 100x, 500x, 1500x. . . .	XIII
B.2. PCL/PLA 100/50mg/ml en diferentes magnificaciones: 100x, 500x, 1500x.	XIII
B.3. PCL/PLA 75/75mg/ml en diferentes magnificaciones: 100x, 500x, 1500x.	XIV
B.4. PCL/PLA 50/100mg/ml en diferentes magnificaciones: 100x, 500x, 1500x.	XIV
C.1. Resultados del DSC para el agua destilada.	XV
C.2. Resultados del DSC para el DMEM.	XVI
C.3. Resultados del DSC para el m-SBF.	XVII
C.4. Resultados del DSC para la Tripsina.	XVIII

Índice de cuadros

2.1. Propiedades del PCL [20].	5
2.2. Propiedades del PLLA y PDLA [20].	7
2.3. Parámetros y sus efectos en la morfología de las fibras [18].	9
2.4. Concentraciones de iones de m-SBF en comparación con las del plasma sanguíneo humano [4].	13
3.1. Número detallado de las muestras.	18
3.2. Reactivos, sus purezas y cantidades para la preparación de 1000 ml de m-SBF.	19
4.1. Diámetro de las fibras a lo largo de las semanas.	26
A.1. Disminución de la intensidad en PCL 150 mg/ml.	IX
A.2. Disminución de la intensidad en PCL/PLA 100/50 mg/ml.	X
A.3. Disminución de la intensidad en PCL/PLA 75/75 mg/ml.	XI
A.4. Disminución de la intensidad en PCL/PLA 50/100 mg/ml.	XII
C.1. Evolución de las propiedades térmicas en agua destilada ¹	XIX
C.2. Evolución de las propiedades térmicas en DMEM.	XIX
C.3. Evolución de las propiedades térmicas en Tripsina.	XIX
C.4. Evolución de las propiedades térmicas en m-SBF.	XIX
D.1. Masa de las muestras antes de la incubación. Promedio en mg.	XX
D.2. Masa de las muestras luego de la incubación. Promedio en mg.	XX
D.3. Masa Remanente.	XXI

Abreviaturas

C Carbono

CO₂ Dióxido de Carbono

ddH₂O Agua destilada

DI Agua deionizada

DMEM Medio de Eagle modificado por Dulbecco

DSC Calorímetro diferencial de barrido

eV Electrovolt

ΔH_m Entalpía de fusión

ΔH_c Entalpía de cristalización

FDA Food and Drug Administration

FTIR Espectroscopio infrarrojo por transformada de fourier

H₂O Agua

HCO₃ Ion de Bicarbonato

HFIP Hexafluoroisopropanol

m-SBF Fluido corporal simulado modificado

PCL Policaprolactona

PLA Ácido Poliláctico

SEM Microscopio electrónico de barrido

T_c Temperatura de cristalización en frío

T_g Temperatura de transición vítrea

T_m Temperatura de fusión

UV Luz ultravioleta

1. Introducción

La Bioingeniería, y aún más la Ingeniería de Tejidos, está en constante desarrollo. Al centrarse en los materiales, el objetivo es encontrar aquellos que presenten la mejor combinación de simplicidad del método de fabricación, propiedades mecánicas y estructurales, biodegradabilidad y biocompatibilidad. Esta última se refiere a la capacidad del material para evitar que se desencadene una respuesta inflamatoria en el sistema biológico correspondiente. En los estudios de degradación, este atributo es crucial, ya que también debe tenerse en cuenta la biocompatibilidad de los subproductos liberados durante este proceso. Cuando se cumple esta propiedad, se facilita el tratamiento de implantes o injertos, ya que la instancia final tras la recuperación o la regeneración del tejido dañado, no es una intervención quirúrgica para extraer éstos del organismo.

La motivación es estudiar el comportamiento de diferentes materiales, en este caso polímeros, durante su degradación y así, evaluar su utilidad y comparar los correspondientes procesos evolutivos en condiciones fisiológicas. Esto permitiría comprenderlos mejor en la fase de selección de materiales en el diseño de un andamio.

En este trabajo se han producido andamios de cuatro soluciones poliméricas diferentes de PCL y PLA para analizar su proceso de degradación en cuatro medios de cultivo. La degradación hidrolítica se realiza en agua y 2 soluciones tamponadas, y la degradación enzimática se lleva a cabo mediante la Tripsina. La observación se efectúa durante un periodo de tiempo de 12 semanas, durante el cual las muestras se mantienen en la incubadora a 37°C y se extraen de los medios de degradación cada 3 semanas para su análisis. En particular, se comparan el proceso de degradación y las variables implicadas, como las propiedades térmicas, químicas y morfológicas, y se evalúa la influencia de la concentración de PLA en el PCL. Comprender el comportamiento de degradación de estos andamios en diferentes entornos es esencial para predecir su comportamiento *in vivo* y optimizar su diseño para diversas aplicaciones de Ingeniería Tisular. Por lo tanto, se espera que los resultados de este estudio proporcionen información sobre el potencial de los andamios electrohilados de PCL y PLA para la Bioingeniería.

2. Fundamentos teóricos

La Ingeniería de Tejidos es un campo interdisciplinar que integra conocimientos de Medicina, Biología, Ingeniería y Ciencia de los Materiales [10]. Históricamente, el método más extendido para el tratamiento de tejidos dañados o perdidos ha sido el trasplante de tejidos sanos. Sin embargo, en la actualidad la tendencia se dirige hacia el desarrollo de biomateriales cuyas características biológicas y fisiológicas se asemejen a las del tejido nativo y promuevan su regeneración [33]. La Ingeniería de Tejidos pretende desarrollar materiales tridimensionales vivos que permitan la regeneración de tejidos dañados. Para ello se utilizan andamios (en inglés, *scaffolds*), que son estructuras que imitan la matriz extracelular y consisten en una red porosa. Estos andamios favorecen la adhesión, proliferación, diferenciación y crecimiento celular, sin provocar una respuesta inflamatoria, lo que favorece la reparación del tejido injertado [27].

Las propiedades deseadas al fabricar andamios son una elevada porosidad para facilitar la infiltración y proliferación celular [29], biocompatibilidad, una biodegradación con una velocidad relacionada con su función como implante, es decir, debe coincidir con el tiempo de regeneración o cicatrización del tejido nativo, y también propiedades mecánicas compatibles con el tejido [22, 32]. Una de las técnicas más estudiadas para la síntesis es el electrohilado (en inglés *electrospinning*), ofreciendo como ventajas fibras nanométricas comparables al tamaño de las procedentes de la matriz extracelular del tejido, porosidad controlable, alta relación superficie/volumen y mejores propiedades físico-mecánicas ya que pueden ser manipuladas en función de los parámetros de la solución y del proceso [11]. Estas características favorecen la adhesión celular y la difusión de nutrientes y productos de desecho.

Una aplicación de los andamios es, por ejemplo, la reparación de tejido óseo (Fig. 2.1). Primero se implantan andamios bioactivos en la matriz ósea y a continuación, gracias a la estructura ósea y a la composición de los propios materiales, se inducen células madre endógenas y factores de crecimiento que se difunden directamente en el andamio, cubriéndolo por completo. Como resultado, el andamio favorece la proliferación celular y la diferenciación osteogénica² reparar el defecto y regenerar el tejido óseo [30].

²Proceso biológico en el que las células madre precursoras se transforman en osteoblastos (células especiales del tejido óseo)[31].

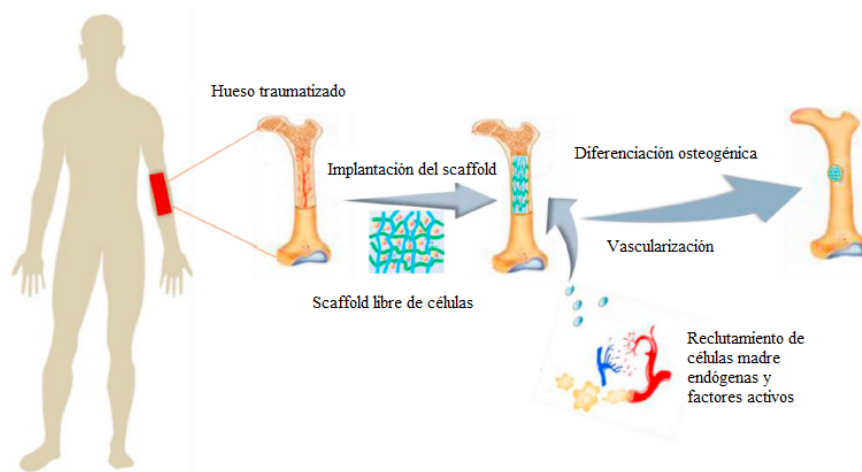


Figura 2.1: Descripción esquemática de la estrategia de andamiaje para el tratamiento de defectos óseos [30].

2.1. Materiales

2.1.1. Materiales poliméricos

El origen de la palabra polímero deriva del griego "poly", que significa muchos, y "meros", que indica la existencia de partes. Así, como su nombre indica, un polímero es una macromolécula formada por la repetición de unidades estructurales llamadas monómeros. Este material se compone principalmente de los elementos Carbono, Hidrógeno y Oxígeno, y sus tipos difieren en función de sus fuerzas inter e intramoleculares, así como de los grupos funcionales que los componen. El tiempo de degradación de los polímeros es función de la longitud de sus cadenas y de sus grupos funcionales [27]. La IUPAC³ define los polímeros de base biológica como sustancias macromoleculares cuya materia prima es de origen biológico, ya sea vegetal, animal o microorganismos, mientras que los polímeros biodegradables se definen como aquellos que pueden descomponerse en porciones más pequeñas por la acción de microorganismos presentes en el medio ambiente. A la hora de elegir un polímero para la fabricación de un andamio, éste no sólo debe garantizar su biocompatibilidad y biodegradabilidad, sino que sus propiedades mecánicas también deben ser adecuadas para soportar la carga temporal y el crecimiento celular durante el periodo de regeneración. Además, el método de fabricación debe tener en cuenta que la porosidad y morfología conseguidas sean adecuadas para la adhesión y proliferación celular. El andamio obtenido debe tener suficientes enlaces físicos interatómicos e intermoleculares, así como una estructura química que permita el ataque hidrolítico [27].

De todos los polímeros, la familia de los poliésteres alifáticos parece ser actualmente la más atractiva y prometedora. La Policaprolactona (PCL) y el Ácido Poliláctico (PLA) se han estudiado ampliamente en aplicaciones biomédicas debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad [7]. El hecho de que en los procesos de descomposición hidrolítica y enzimática los productos puedan ser metabolizados por el cuerpo humano es lo que los pone en el punto de mira [1]. El PLA es uno de los polímeros más desarrollados

³ Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad y materia prima de origen vegetal. También tiene buenas propiedades mecánicas, como un módulo elevado y una gran resistencia mecánica. El PCL, al igual que el PLA, es un poliéster alifático biodegradable y biocompatible, pero con propiedades mecánicas diferentes: tiene un alargamiento a la rotura y una dureza elevados. Por lo tanto, al mezclarlos, se pueden obtener mejores propiedades, lo que se traduce en una mayor ductilidad y dureza del PLA, al tiempo que se mejora la resistencia mecánica del PCL [24]. Sin embargo, a pesar de las ventajas de las mezclas de PCL y PLA, el control de la degradación de estos materiales sigue siendo un reto importante. Por lo tanto, es esencial analizar el comportamiento de degradación de las mezclas de PCL y PLA para comprender mejor su uso en aplicaciones de Ingeniería Tisular.

2.1.2. Policaprolactona y Ácido Poliláctico

La Policaprolactona es un poliéster sintético, semicristalino y alifático que se obtiene mediante la Polimerización de Apertura de Anillo (ROP) de ϵ -caprolactona. Se compone de unidades hexanoato repetidas [20]. Su fórmula química es $(C_6H_{10}O_2)_n$ y su estructura química se muestra en Fig. 2.2.

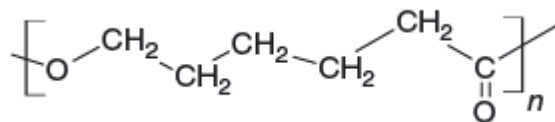


Figura 2.2: Estructura química del PCL [20].

Las propiedades físicas, mecánicas y térmicas de la PCL dependen principalmente del peso molecular y la cristalinidad. Su gran versatilidad de la Policaprolactona se debe a que sus propiedades pueden modificarse mediante copolimerización o mezcla gracias a su capacidad para ser miscible y mecánicamente compatible con otros polímeros. [22].

Cuadro 2.1: Propiedades del PCL [20].

Propiedad	PCL
No. peso molecular medio M_n en g/mol	530-630.000
Temp. de transición vítrea T_g en °C	-65 a -60
Temp. de fusión T_m en °C	56-65
Densidad en g/cm ³	1.071-1.200
Temp. de descomposición en °C	350
Resistencia a la tracción σ en MPa	4-785
Módulo de Young E en GPa	0,21-0,44
Alargamiento a la rotura ϵ en %	20-1000

Se observa que tiene un elevado alargamiento a la rotura, una alta tenacidad y una baja resistencia a la tracción. Debido a su baja temperatura de transición vítrea,

el PCL tiende a mantener un estado gomoso y una alta permeabilidad en condiciones fisiológicas [25]. La investigación en el campo de la ingeniería de tejidos sobre este polímero y sus posibles aplicaciones es cada vez mayor debido a su excelente biocompatibilidad con los tejidos vivos y su lenta tasa de degradación. La Policaprolactona también ha sido aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) para aplicaciones específicas en el cuerpo humano como dispositivo de administración de fármacos, sutura o barrera de adherencia [22].

El Ácido Poliláctido es también un poliéster alifático, formado por polimerización por condensación del ácido láctico[20]. Su fórmula química es $(C_3H_4O_2)_n$ y su estructura química se presenta en Fig. 2.3.

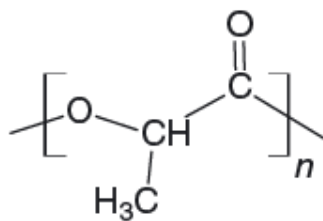


Figura 2.3: Estructura química del PLA [20].

La síntesis del PLA comienza con la producción de ácido láctico y su posterior polimerización. En cuanto al ácido láctico, se trata de un ácido carboxílico con un grupo hidroxilo (OH) en el C adyacente al grupo carboxilo (-COOH) lo que lo convierte en un α -hidroxiácido de fórmula: $(C_3H_6O_3)_n$; dada su quiralidad⁴, hay dos enantiómeros:

- Dextrógiro: ácido d-láctico
- Levógiro: ácido l-láctico

Los monómeros básicos (ácido láctico) se producen por fermentación de carbohidratos, como la celulosa de maíz, mandioca o caña de azúcar [9]. Como polímero de base biológica, biodegradable y biocompatible, también se investiga ampliamente para aplicaciones biomédicas. Además cuenta con la aprobación de la FDA para algunas aplicaciones clínicas, lo que garantiza que se trata de un producto cuyos beneficios superan los riesgos potenciales. El PLLA (ácido poli- L -láctico) se degrada por hidrólisis en ácido láctico y es reabsorbible y no tóxico [14].

Sus propiedades físicas, mecánicas y térmicas dependen de sus características moleculares, la presencia de estructuras ordenadas, el grosor del cristal y la cristalinidad, entre otras.

⁴Quiralidad: Propiedad de un elemento de no solapar su imagen especular.

Cuadro 2.2: Propiedades del PLLA y PDLA [20].

Propiedad	PLLA	PDLA
Temp. de transición vítrea T_g en °C	62,1;50-65	50-603
Temp. de fusión T_m en °C	106-122;170-190	165-187
Densidad en g/cm ³	1,25-1,29	1,24
Resistencia a la tracción σ en MPa	0,08-1	-
Módulo de Young E en GPa	2,7-16	3,2-7,9
Alargamiento a la rotura ε %	30-40	-

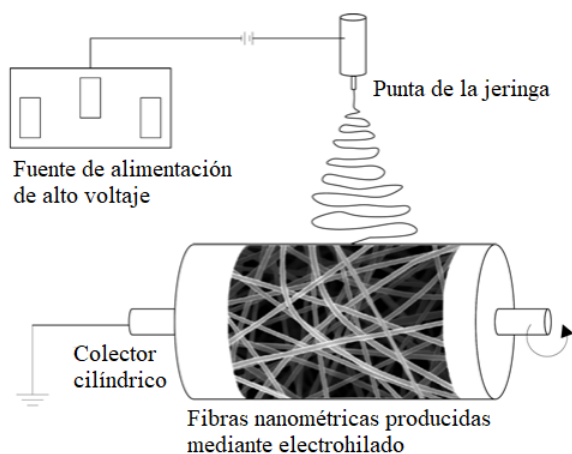
Sus propiedades ventajosas son su elevado módulo y su gran resistencia mecánica. Pero dada su baja temperatura de transición vítrea y su baja tasa de recristalización, el PLA tiene una baja temperatura de trabajo.

2.2. Dispositivos

2.2.1. Dispositivo de electrohilado o electrospinning

■ Principios y ventajas

Se trata de una tecnología que, aplicando un campo eléctrico sobre una solución polimérica, produce fibras de diámetros nanométricos. Sus partes principales son la fuente de alta tensión, la jeringa y el colector.

**Figura 2.4:** Diagrama esquemático del montaje básico de electrohilado.

Las ventajas de esta técnica de producción son las fibras resultantes con alta porosidad, alta relación superficie/volumen, tamaño de fibra controlable, diámetros nanométricos y propiedades físico-mecánicas mejoradas [11, 10].

■ Proceso

La solución de polímero se coloca en una jeringa que será accionada por una bomba de jeringa. La aguja de la bomba estará conectada a la fuente de tensión,

al igual que el colector y cuando se enciende, una gota de solución sale de la aguja y se mantiene allí por su tensión superficial. Por lo tanto, al prender la fuente de alta tensión, la solución se someterá a un campo eléctrico y se inducirá una carga en la superficie del líquido de polaridad opuesta a la del colector. Al aumentar la intensidad del campo electrostático, las cargas inducidas en la superficie se repelen entre sí y producen tensiones de cizallamiento. Estas fuerzas de repulsión actúan en la dirección opuesta a la tensión superficial, lo que conduce a la extensión de la gota de solución en un cono de Taylor. Una vez que el campo eléctrico alcanza un valor crítico y las fuerzas eléctricas vencen a las fuerzas de tensión superficial, un chorro de solución cargada es expulsado desde la punta de la aguja hacia el colector [11, 34].

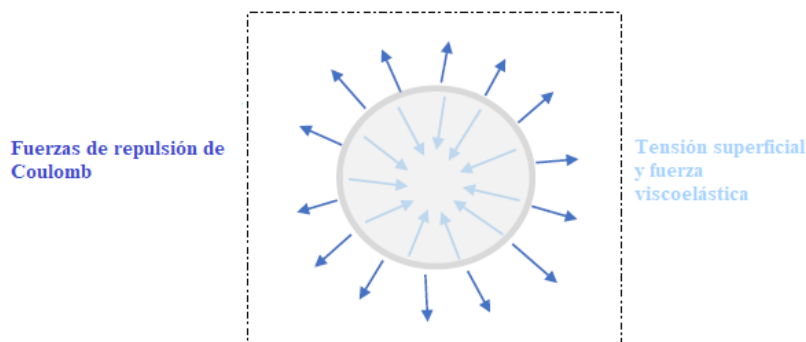


Figura 2.5: Sección transversal del chorro y fuerzas implicadas [34].

Cuando la tensión aumenta hasta un valor en el que el campo eléctrico destruye el equilibrio de la gota de solución, ésta sufre una distorsión formando el cono de Taylor, con un ángulo medio de $49,3^\circ$. Como puede observarse (Fig. 2.6), seguido del cono de Taylor los chorros cargados expulsados pasan en línea casi recta. Luego le preceden trayectorias de chorros en bucle y en espiral, durante las cuales se estiran y adelgazan por fuerzas eléctricas en gran medida, acompañadas de la evaporación de disolventes para formar nanofibras solidificadas [18].

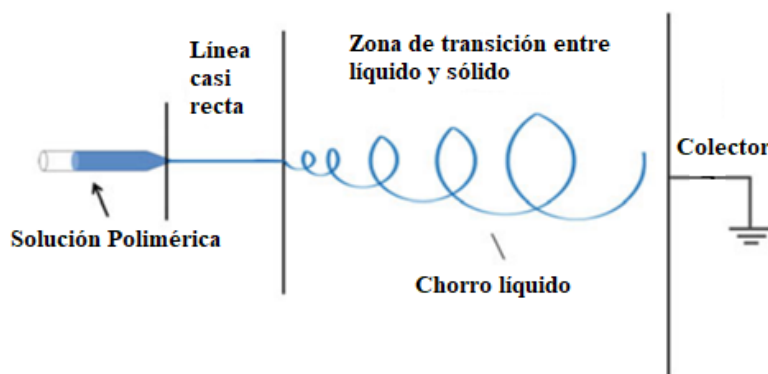


Figura 2.6: Ilustración esquemática de la trayectoria del chorro entre la punta de la jeringa y el colector [18].

■ Variables

Las variables del proceso de electrohilado que tienen una gran influencia en la

morfología de las fibras resultantes se presentan en forma de tabla (Tabla 2.3).

Cuadro 2.3: Parámetros y sus efectos en la morfología de las fibras [18].

Parámetros	Efecto en la morfología de la fibra
<u>Parámetros de la solución</u>	
Viscosidad	Una viscosidad baja da lugar a fibras no uniformes y una viscosidad alta dificulta la expulsión del chorro de polímero.
Concentración polimérica	Aumento del diámetro de la fibra con el aumento de la concentración.
Peso molecular del polímero	Reducción del número de microesferas y gotas al aumentar el peso molecular.
Conductividad	Disminución del diámetro de las fibras con el aumento de la conductividad.
Tensión superficial	Una tensión superficial elevada provoca la inestabilidad de los chorros.
<u>Parámetros de procesamiento</u>	
Voltaje aplicado	Disminución del diámetro de la fibra con el aumento de la tensión.
Distancia entre la punta y el colector	Con distancias extremadamente cortas o largas, se generan perlas. Se requiere una distancia mínima para obtener fibras uniformes.
Velocidad de alimentación	Disminución del diámetro de la fibra con la disminución del caudal.
<u>Parámetros ambientales</u>	
Humedad	La humedad elevada produce poros circulares en las fibras.
Temperatura	Disminución del diámetro de la fibra con el aumento de la temperatura.

2.2.2. Dispositivos de caracterización

■ Microscopio electrónico de barrido (SEM)

Se trata de un dispositivo utilizado para observar y caracterizar la morfología, la textura y la composición química de muestras sólidas. Produce imágenes detalladas y ampliadas de un objeto escaneando su superficie para crear una imagen de alta resolución.

Su principio de funcionamiento se basa en la interacción resultante de la incidencia de un haz de electrones sobre la muestra analizada, que emitirá electrones que proporcionarán señales. La imagen se crea mediante la combinación de la posición del haz de electrones y la cantidad y energía detectadas de dichos electrones. Los componentes fundamentales de este microscopio son la torre hermética que proporciona un alto grado de vacío, para que nada obstruya el paso del haz de electrones y éste llegue a la muestra de forma precisa, y las lentes electromagnéticas, hay condensadoras y objetivo. Las primeras desvían la trayectoria de los electrones y las segundas controlan el punto focal de la muestra. Ambas disponen

de bobinas a las que se suministra energía para inducir el campo magnético, lo que significa que, controlando el flujo de corriente, el haz se enfoca en un punto y recorre la muestra.

Especialmente cuando se va a realizar un análisis morfológico, el objetivo es detectar electrones secundarios (SE), que son de baja energía (del orden de 50 eV). Para realizar el estudio exitosamente, las muestras sólidas deben estar libres de humedad y ser conductoras (si no lo son, se recubren de oro o carbono).

- Calorímetro diferencial de barrido (DSC)

Este calorímetro es un dispositivo basado en una técnica de caracterización para la determinación de las propiedades térmicas. La cantidad de calor absorbido o eliminado durante las transiciones se mide determinando la diferencia de flujo de calor entre la muestra y la referencia. El resultado es un gráfico del flujo de calor en función de la temperatura o el tiempo [35].

Su componente más importante es el sensor, que debe poseer una alta sensibilidad para detectar transiciones que impliquen flujos de calor muy bajos y también debe tener una alta resolución para separar efectos muy próximos entre sí. El DSC permite identificar los materiales, evaluar sus condiciones y determinar sus propiedades (T_g , T_m , T_c , T_r , ΔH_m , ΔH_c , ΔH_r , c_p). En función del objetivo del análisis, se utilizan ciclos de calentamiento y enfriamiento en el proceso.

- Espectroscopio infrarrojo por transformada de fourier (FTIR)

El FTIR se utiliza para determinar la composición química de las muestras a lo largo del proceso de degradación. Estudia la interacción entre la sustancia y la radiación infrarroja que atraviesa el material provocando la vibración de enlaces moleculares específicos, siendo el tipo de vibración resultante dependiente de la masa del átomo y de la frecuencia. Así, parte de la energía total se absorbe y parte se transmite. La energía transmitida es recogida por un detector para producir una señal electrónica que se convierte en un espectro de transmisión [36].

Para obtener el espectro, primero hay que tener en cuenta las condiciones ambientales y generar un espectro de referencia. A continuación se realiza el espectro correspondiente a la muestra y al combinarlo con el anterior se obtiene el espectro infrarrojo de transmisión. Éste representa la energía transmitida por la materia frente a la longitud de onda o número de onda. La interpretación del gráfico resultante se hace con rangos de números de onda ya tabulados donde se indica qué tipo de enlace químico se espera en esa región, como se muestra a continuación.

- Región X–H: 2500-4000 cm^{-1}

1. C–H Enlaces

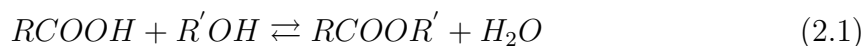
Enlace químico	Frecuencia [cm^{-1}]
C–H sp^3	2800-3000
C–H sp^2	3040-3125
C–H sp	3270-3340

- 2. Enlace N–H: 3330-3450 cm^{-1}
- 3. Enlace O–H: caracterizada por una absorción muy amplia en torno a 3200-3600 cm^{-1}
- Región de triples enlaces: 2000-2500 cm^{-1}
 - 1. Triple enlace $\text{C}\equiv\text{C}$: 2100-2160 cm^{-1}
 - 2. Triple enlace $\text{C}\equiv\text{N}$: 2250 cm^{-1}
 - 3. Triple enlace $\text{C}\equiv\text{O}$: 2140 cm^{-1}
- Región de dobles enlaces: 1500-2000 cm^{-1}
 - 1. Doble enlace $\text{C}=\text{C}$: 1620-1680 cm^{-1}
 - 2. Doble enlace $\text{C}=\text{C}$: en los ésteres se produce a 1730 cm^{-1}
- Región "huella digital": 400-1500 cm^{-1} . Aquí se encuentran enlaces que caracterizan al compuesto y lo hacen único, como los enlaces C–H, C–O, C–N, C–C.

2.3. Degradación de polímeros

Existen dos tipos de procesos de degradación, la biótica y la abiótica. En la primera, los materiales son descompuestos por organismos vivos como hongos y bacterias, este es el caso de la degradación por acción enzimática; mientras que en la degradación abiótica no hay ayuda de organismos vivos sino que la descomposición del material se debe a fenómenos químicos, físicos o ambientales como la hidrólisis [9]. La degradación de los polímeros depende de su composición química, peso molecular, morfología, hidrofobicidad, cristalinidad, historia térmica y mecánica y de las condiciones en las que se produce la hidrólisis [9, 19, 32, 1].

En los poliésteres alifáticos, la degradación hidrolítica es una reacción química que se produce cuando el polímero se expone a soluciones acuosas. Durante el proceso de hidrólisis, las moléculas de agua reaccionan con los grupos éster de la cadena polimérica, dividiéndolos y produciendo ácido carboxílico (primer término a la izquierda de la reacción (2.1)) y alcohol (segundo término a la izquierda de la reacción (2.1)) como productos de reacción [15, 1]. Como puede verse, el camino de ida es la condensación que forma el poliéster, mientras que el camino de vuelta es la hidrólisis del poliéster.



La degradación consta de 2 etapas, en la primera el agua es absorbida por el enlace éster y, como consecuencia, en la segunda tiene lugar la escisión hidrolítica de los grupos éster. Inicialmente, los productos de la reacción no son lo suficientemente pequeños como para ser solubles en el medio, por lo que no se produce un cambio significativo en la masa del material. Sin embargo, a medida que transcurre el tiempo de degradación, la hidrólisis provocará una disminución del peso molecular de los productos resultantes, lo que permitirá su difusión en el medio degradante causando una reducción significativa de la masa [9, 22, 32, 1, 28]. A su vez, la hidrólisis comenzará atacando las regiones amorfas donde la difusión del agua es mayor; esto aumentará el espacio

y la capacidad de las moléculas para moverse y reorganizarse, lo que aumentará la cristalinidad [9].

La hidrólisis se modela generalmente mediante cinética de primer orden, es decir, la velocidad de degradación es proporcional a la concentración de una sola especie. En la ecuación 2.2, k es la constante de velocidad de hidrólisis asociada a la probabilidad de división molecular, E es la concentración de ésteres y W es la concentración de agua [1].

$$\frac{dE}{dt} = -k \cdot E \cdot W \quad (2.2)$$

Dado que la hidrólisis será más rápida cuanto mayor sea la concentración de grupos de ácido carboxílico, los productos de degradación podrían catalizar la reacción acelerándola aún más debido a los productos liberados que reducirán el pH de la solución. Si este efecto autocatalítico es considerable, podría ser muy perjudicial porque induciría una respuesta inflamatoria y efectos tisulares adversos [6, 14, 28].

La degradación enzimática es un proceso de hidrólisis en el que se acelera la pérdida de los productos de reacción. Es decir, no se acelera la escisión de los enlaces éster en sí. Las enzimas capaces de catalizar la hidrólisis se denominan hidrolasas [3]. En los poliésteres alifáticos, la degradación por acción enzimática consta de 3 etapas. Primero, la adsorción de la enzima en la superficie del sustrato. En segundo lugar, la catálisis de la hidrólisis del enlace éster con la consiguiente y continua disminución del peso molecular. Y por último, la escisión de todas las cadenas poliméricas que sufren una pérdida de peso importante como consecuencia de la pérdida de productos de degradación [3, 17, 8, 5]. Este tipo de degradación procede principalmente en la superficie de los polímeros debido a su condición hidrofílica que impide la penetración en polímeros hidrofóbicos, como el PLA y el PCL. Por ello, en los materiales porosos, donde la superficie disponible es mayor que en los materiales no porosos, la degradación enzimática tiene un mayor efecto.

Una vez que el peso molecular alcanza un determinado valor, entre 3000-5000 g/mol para el PCL por ejemplo [9, 22], se produce una pérdida de peso. Mientras que en el caso de la degradación enzimática, este valor de peso molecular es mayor y, por lo tanto, se dice que la pérdida de masa es acelerada [3].

2.3.1. Soluciones para la degradación

- El agua destilada es agua purificada mediante un proceso de destilación. El agua se hierve hasta convertirse en vapor y se condensa de nuevo hasta el estado líquido y, debido a las diferencias en la volatilidad relativa de los componentes, se obtiene una gran pureza. Las sales, minerales, electrolitos y otros materiales orgánicos se eliminan recogiendo el vapor del agua hirviendo. La diferencia entre el agua y los fluidos de degradación que se mencionan a continuación es que el agua es una solución no tamponada, es decir, no mantiene el equilibrio del pH en los fluidos corporales. Permite evaluar la estabilidad de los polímeros en un medio neutro.

La norma ISO 10993 ⁵⁶ sugiere el uso de agua para laboratorio analítico, grado 2 [12].

- El Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) es un medio basal ampliamente utilizado para preservar y favorecer el crecimiento de diversas células de mamíferos. Al exponer los polímeros a él, es posible simular su comportamiento en un entorno biológico más próximo a las condiciones fisiológicas. El DMEM contiene una concentración equilibrada de iones de sodio, potasio, calcio, magnesio y cloruro para crear un entorno fisiológico que favorezca el crecimiento y la supervivencia de las células. Cuadruplica la concentración de aminoácidos y vitaminas del Medio Esencial Mínimo de Eagle original. Este medio también utiliza un sistema tampón de bicarbonato sódico, lo que permite mantener el pH fisiológico en un ambiente a 5-10 % CO₂ [37]. El pH de esta solución oscila entre 7-7,4.
- Fluidos corporales simulados modificados (m-SBF) se utilizan ampliamente en la evaluación de materiales bioactivos *in vitro*, ya que pueden tener una concentración de iones similar a la del plasma sanguíneo humano. Este medio también se utiliza para imitar las condiciones fisiológicas. En este trabajo concreto, el SBF diseñado tendrá una concentración de iones igual a la del plasma sanguíneo, diferenciándose únicamente en la concentración de HCO₃⁻ [4] (Tabla 2.4). Esta solución se mantendrá a pH y temperatura fisiológicos (7,4 y 37°C respectivamente).

Cuadro 2.4: Concentraciones de iones de m-SBF en comparación con las del plasma sanguíneo humano [4].

Concentración/mM			
Ion	Plasma Sanguíneo		m-SBF
	Total	Disociado	
Na ⁺	142	142	142
K ⁺	5	5	5
Mg ²⁺	1,5	1	1,5
Ca ²⁺	2,5	1,3	2,5
Cl ⁻	103	103	103
HCO ₃ ⁻	27	27	10
HPO ₄ ²⁻	1	1	1
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5	0,5

⁵ International Organization for Standardization.

⁶ ISO 10993: Evaluación biológica de productos sanitarios.

- La Tripsina es una enzima hidrolasa, es decir, es capaz de catalizar la hidrólisis de un enlace químico [17]. Dentro de la caracterización de las hidrolasas, la tripsina es una peptidasa, definida como capaz de romper los enlaces peptídicos de las proteínas. Es una enzima producida en el páncreas, que por hidrólisis escinde los enlaces peptídicos de las proteínas para formar péptidos más pequeños o aminoácidos. Aunque está presente en el suero humano, no es específica del plasma y no tiene ninguna función fisiológica en él [5]. Su presencia puede deberse simplemente al recambio de células dentro del tejido que desencadena la liberación de esta enzima. Este tipo de hidrolasas está relacionada con la respuesta inflamatoria de los tejidos, ya que en las fases iniciales de ciertas enfermedades se produce una inflamación en la interfase biomaterial-tejido que da lugar a la adsorción superficial de proteínas plasmáticas y a la liberación de enzimas proteolíticas. En estos casos, su función es reducir la inflamación [5].

Todas las enzimas se clasifican según su número de comisión enzimática en función de las reacciones químicas que catalizan y la tripsina se identifica como EC.3.4.21.4 [5].

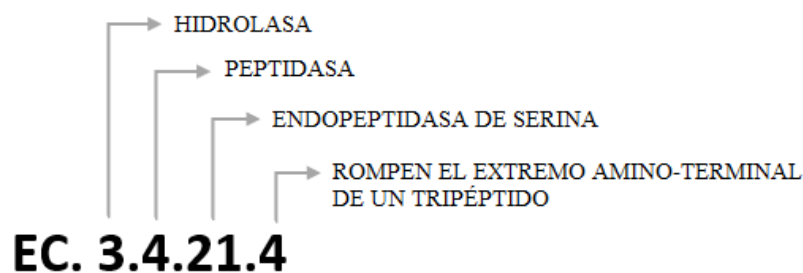


Figura 2.7: Nomenclatura de la enzima.

Los valores óptimos de pH y temperatura para la conservación de esta enzima son 8 y 37°C, respectivamente.

2.4. Estado del arte

En los últimos años se han publicado varios estudios sobre la degradación de los polímeros [1, 8, 3, 5, 28, 22, 6, 14, 33, 26, 23, 13]. Algunos se centran en la degradación hidrolítica y otros en la enzimática, o en ambas. Estos trabajos explican las variables que más influyen en estos procesos y en consecuencia, los analizan. RAHMAN (2012) estudia los agentes de degradación *in vivo* (en el cuerpo humano) de los poliésteres y detalla los diferentes tipos de hidrólisis para comparar la situación *in vivo* con aquella *in vitro* [15]. VIEIRA (1993) explica la degradación hidrolítica y sus variables, y luego analiza la evolución de las propiedades mecánicas [1]. SULTANA (2011) compara el efecto de la degradación en andamios y películas delgadas, considerando conceptos como la porosidad del material, el efecto autocatalítico adverso que puede generar y hace una evaluación de los posibles tipos de erosión [14]. CAI (2002) investigó y comparó la degradación hidrolítica del poliéster alifático poli(lactida-co-clicol) (PGLA) con la degradación enzimática mediada por tripsina, concluyendo que por acción de la tripsina la degradación se aceleraba porque la enzima aumentaba la pérdida

de productos de degradación [3]. TSUJI (2018) y ZHANG (2015) se centraron en el proceso de hidrólisis sufrido por el Ácido Poliláctico analizando su comportamiento morfológico y el cambio de propiedades térmicas experimentado [26, 20]. Las aplicaciones y propiedades de las mezclas de ácido poliláctico fueron estudiadas por NOFAR (2018), quien analizó la combinación PLA/PCL y concluyó que una alta concentración de PCL en una muestra ralentiza la hidrólisis debido a la difusión del agua en la fase dispersa del PLA hacia el PCL [24]. La degradación enzimática de estas mezclas también fue investigada por LIU (2000), quien descubrió que la resistencia al ataque enzimático es función del tipo de enzima y del uso de PLA amorfo o semicristalino [2]. Los cambios en la composición química de los andamios de PCL tras un proceso de degradación son presentados por MIM MIM (2017) quien los describe en detalle mediante el estudio de gráficas FTIR [21]. En su publicación, Azevedo (2004) ofrece una explicación exhaustiva de la degradación enzimática y presenta un estudio de caso que incluye la evaluación de los cambios de propiedades mediante DSC y FTIR [5]. Por ello, este trabajo compara los resultados obtenidos con algunas de las investigaciones mencionadas, analizando tanto los cambios en las propiedades durante la degradación como los parámetros que influyen significativamente en el proceso de degradación.

3. Métodos y Materiales

3.1. Preparación de las soluciones

Para investigar el comportamiento de los andamios fibrosos fabricados por electrospinning de los polímeros PCL y PLA, se prepararon las siguientes mezclas: PCL 150mg/ml, PCL/PLA 100/50mg/ml, PCL/PLA 75/75mg/ml y PCL/PLA 50/100mg/ml.

Policaprolactona ($M_n = 80.000$ g/mol, Aldrich) y PLA (ácido poli-L-láctico) fueron utilizados. Estas mezclas poliméricas se disolvieron en Hexafluoroisopropanol (HFIP) (ABCR) y se agitaron durante 24 horas.

3.2. Proceso de electrohilado

Las soluciones mencionadas se transfirieron a una jeringa de 15,60mm de diámetro conectada a una aguja de 0,8x22mm. La jeringa se conectó a una bomba de jeringa y se fijó un caudal de 3ml/h. La distancia entre la punta de la aguja y la jeringa fue de 24cm. La velocidad del colector se mantuvo en 250rpm y su superficie se cubrió con papel de aluminio. Se aplicó un voltaje constante de 16kV durante todo el proceso. Cada estera de fibra está compuesta por 5ml de solución polimérica y con una velocidad de alimentación de 3ml/h la duración era de 100min por estera de fibra.

3.3. Preparación de las muestras

La preparación de las muestras consistió en cortarlas, pesarlas y esterilizarlas [16]. Con la ayuda de un molde de corte se obtuvieron muestras de aproximadamente una pulgada de diámetro. Como indica la norma [12], el número mínimo de muestras por periodo de tiempo es de 3, y considerando 5 periodos de tiempo con 4 medios de degradación, se cortaron 204 muestras.

Cuadro 3.1: Número detallado de las muestras.

Polímero	Semana	Medio					Total
		ddH ₂ O	DMEM	m-SBF	Tripsina	Sin medio	
PCL 150	S0	-	-	-	-	3	3
	S3	3	3	3	3	-	12
	S6	3	3	3	3	-	12
	S9	3	3	3	3	-	12
	S12	3	3	3	3	-	12
PCL/PLA 100/50	S0	-	-	-	-	3	3
	S3	3	3	3	3	-	12
	S6	3	3	3	3	-	12
	S9	3	3	3	3	-	12
	S12	3	3	3	3	-	12
PCL/PLA 75/75	S0	-	-	-	-	3	3
	S3	3	3	3	3	-	12
	S6	3	3	3	3	-	12
	S9	3	3	3	3	-	12
	S12	3	3	3	3	-	12
PCL/PLA 50/100	S0	-	-	-	-	3	3
	S3	3	3	3	3	-	12
	S6	3	3	3	3	-	12
	S9	3	3	3	3	-	12
	S12	3	3	3	3	-	12

Posteriormente, cada muestra se pesó con una balanza de escala fina (precisión de lectura 0,1 mg, Sartorius) para obtener el valor de masa inicial con el que se calcula la pérdida de masa a lo largo de las semanas. El siguiente paso consistió en esterilizar las muestras con luz ultravioleta (UV) para eliminar cualquier resto de vida microbiana que pudiera haber en la superficie de los andamios o en los recipientes en los que se habían colocado. Cada cara de los andamios se expuso a ella durante 15 minutos.

3.4. Preparación de los medios de degradación

Se utilizarán agua destilada, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Art.-No. 9007.1, ROTH) y fluido corporal simulado modificado (m-SBF), para la degradación hidrolítica, y Tripsina, para la enzimática. Sólo el m-SBF se prepara a partir de cero, ya que los demás están disponibles en el mercado. En el caso del DMEM, después del baño de agua a 37°C, se añadirán 5,8 ml de Penicilina-Estreptomicina (Sigma-Aldrich) (como suplemento estéril) por cada 500 ml de fluido, ya que previene la contaminación bacteriana de los cultivos celulares y provoca la inhibición de la síntesis proteica y la muerte de las bacterias susceptibles.

Para la preparación del m-SBF, se siguieron los pasos detallados por OYANE (2002), con el objetivo de obtener una solución con la misma concentración de iones que el plasma sanguíneo, difiriendo únicamente en la cantidad de HCO_3^- [4]. Los siguientes compuestos, en las cantidades indicadas (Tabla 3.2), serán los empleados para preparar 1 litro de m-SBF.

Cuadro 3.2: Reactivos, sus purezas y cantidades para la preparación de 1000 ml de m-SBF.

Reactivos	Pureza	Cantidad [g]
NaCl	99,5	5,403
NaHCO ₃	99,5	0,504
Na ₂ CO ₃	99,5	0,426
KCl	99,5	0,225
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	99	0,230
MgCl ₂ · 6H ₂ O	98	0,311
0,2M-NaOH	-	100 ml
HEPES	99,9	17,892
CaCl ₂	95	0,293
Na ₂ SO ₄	99,9	0,072

Se vierten aproximadamente 700 ml de agua desionizada en un vaso de precipitados de 2 litros y se colocan en el agitador magnético a una temperatura de 37°C. Se añaden secuencialmente los compuestos químicos en el orden especificado, asegurándose de que cada reactivo se disuelve completamente antes de añadir el siguiente.

El cálculo de la cantidad necesaria de NaOH para la disolución en 100 ml de DI se realizó de la siguiente manera:

0,2M-NaOH: 40 g/mol

$$n_s = C \cdot V = 0,2 \text{ M} \cdot 0,0001 \text{ m}^3 = 200 \text{ mol/m}^3 \cdot 0,0001 \text{ m}^3 = 0,02 \text{ mol} \quad (3.1)$$

Siendo,

- n_s = cantidad de soluto [mol]
- c = concentración molar [mol/m³]
- V = volumen [m³]

$$m = n_s \cdot M = 0,02 \text{ mol} \cdot 40 \text{ g/mol} = 0,8 \text{ g NaOH} \quad (3.2)$$

100 ml de agua DI y los 0,8 g de NaOH fueron vertidos dentro del vaso de 200 ml. Esta solución también se agitó a 37°C hasta que se disolvió por completo. A continuación, se comprobó el pH de esta solución con un dispositivo de electrodos (Mettler Toledo). El pH obtenido fue de 12,26, que se consideró adecuado ya que el valor teórico era de 13. La solución de hidróxido de sodio con agua desionizada continuó agitándose y se añadió la cantidad necesaria de HEPES⁷.

⁷HEPES= 2-(4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil)etanosulfónico

Se añaden los compuestos químicos que faltan y, por último, se evalúa el pH de la solución resultante. El pH obtenido es de 7,66, que se considera adecuado ya que el valor teórico deseado es de 7,4.

Por último, se ajusta el volumen total de la solución a 1 litro con ayuda de un matraz y se añade más agua desionizada según sea necesario. Una vez alcanzado el volumen deseado, se transfiere a un matraz de vidrio de 1 litro y se guarda en la heladera. A continuación, el SBF preparado se filtra a través de un filtro estéril ventilado situado en una campana de extracción de gases de laboratorio para eliminar cualquier partícula de polvo y bacterias del fluido. Ya se ha demostrado que el pH y las concentraciones de iones no se ven afectados por el proceso de filtrado.

3.5. Proceso de degradación

Una vez que tanto las muestras como los medios de degradación están listos, el siguiente paso es sumergir las muestras en ellos. Cada muestra se coloca en su lugar correspondiente de la placa de muestras y los andamios se esterilizan una vez más antes de su interacción con los medios. Esta esterilización se realiza sumergiendo las muestras en etanol y lavándolas después con agua destilada.

Según la norma ISO 10993, la relación entre la cantidad de fluido de degradación y la masa de la muestra debe ser como mínimo de 10ml:1g [16]. En esta evaluación, cada muestra se sumerge en 3ml de solución de forma que:

- Se garantiza la cobertura total del andamio por el fluido
- Teniendo en cuenta que una parte del fluido puede evaporarse, que aún así se cubra toda la superficie de la muestra
- Los cambios de pH causados por los productos de degradación liberados no sean significativos y no interfieran con el proceso de degradación

Las muestras se incuban a $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ y a una atmósfera de 5 % CO_2 . Como se ha mencionado anteriormente, la extracción de muestras se realiza cada 3 semanas. Durante todo el proceso de degradación, los fluidos se renuevan cada semana ya que, de lo contrario, no se simularía la evacuación de productos de degradación por flujo de fluidos, característica de las condiciones *in vivo* [5].

Al final de los períodos de 3 semanas, las muestras deben lavarse intensamente con agua destilada para eliminar las impurezas y los productos de degradación residuales y, luego, secarse. En este caso, fueron secadas a temperatura ambiente durante al menos 2 semanas bajo la campana extractora de humos. Ya libres de humedad, las muestras se pesaron para determinar los cambios de masa causados por la degradación.

3.6. Proceso de caracterización

La morfología de los andamios poliméricos se examinó con un microscopio electrónico de barrido (S-3400N, Hitachi). Las unidades se recubrieron con oro-paladio mediante un equipo de recubrimiento por pulverización catódica (SC7620, Emitech) con

tres ciclos de 15 segundos cada uno. Se evaluaron tres muestras por solución polimérica y semana en cada medio de degradación, de cada una de las cuales se tomaron 7 imágenes con distintas magnificaciones (x100, x500, x1500). El SEM se ajustó a un voltaje de 20 kV y a una distancia de observación de 10 mm. Cinco de las siete imágenes se tomaron con un aumento de x1500 para luego, con el software AxioVision (SE64 Rel. 4.9.1, Carl Zeiss Microscopy Deutschland), medir los diámetros de las fibras. Para ello, se consideraron tres mediciones a izquierda y derecha de las líneas diagonales.

Las propiedades térmicas de las muestras se evaluaron con el calorímetro diferencial de barrido (DSC 204 F1 Phoenix, Netzsch). Las mediciones se realizaron en andamios de unos 6-9 mg operados a una velocidad de calentamiento de 10°C/min y una velocidad de enfriamiento de 20°C/min. La configuración de la temperatura cambia en función de la solución polimérica, ya que el PCL y el PLA tienen diferentes temperaturas de fusión; por lo tanto, cuando sólo se ensaya un andamio fabricado con PCL, el ciclo comienza con un periodo de enfriamiento desde 22°C a -100°C, tras 5 minutos de temperatura constante, la temperatura aumenta a 100°C y, después de 5 minutos más, el ciclo finaliza con un último periodo de enfriamiento a 20°C. Por su parte, en el caso de las mezclas PCL-PLA, la temperatura máxima de calentamiento pasa de 100°C a 200°C. Las curvas resultantes se evaluaron utilizando el software de análisis térmico Proteus (Netzsch), en el que se identifican la temperatura de fusión, la transición vítrea, la entalpía de fusión y la temperatura de cristalización.

Mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (Spectrum 100, Perkin Elmer) se analizó la composición química de los andamios. El parámetro de barrido es 4000-600 cm⁻¹ y se evalúa la absorbancia. Se crean y fusionan ocho escaneos por muestra.

4. Resultados y discusión

La selección de un polímero para su aplicación en Ingeniería Tisular tiene en cuenta la capacidad del polímero para adaptarse en condiciones fisiológicas sin provocar una respuesta inflamatoria en el organismo y, para ello, la posesión de características adecuadas a lo largo del tiempo. Esto significa garantizar la biocompatibilidad durante todo el periodo de degradación, que idealmente debería coincidir con el periodo de cicatrización o regeneración del tejido dañado. Dada su excelente biocompatibilidad y biodegradación, se han analizado los procesos de degradación de las mezclas de PCL y PLA.

4.1. Espectroscopio infrarrojo por transformada de fourier

Los cambios en la composición química se evaluaron mediante FTIR. Se presentan los espectros obtenidos para los diferentes medios y tipos de polímeros a lo largo de las semanas (Fig. 4.1-4.4).

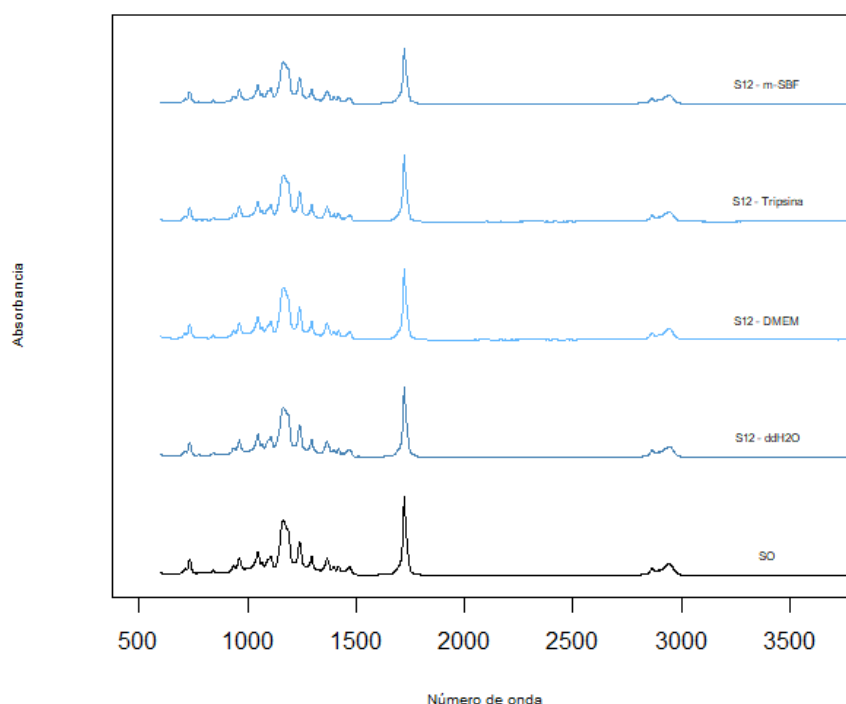


Figura 4.1: Análisis de la estructura química de andamios de PCL 150 mg/ml antes y después de la degradación por 12 semanas.

El PCL es un poliéster alifático con picos de absorción prominentes alrededor de 1040 cm^{-1} (correspondiente a la vibración del enlace C–O–C), 1240 cm^{-1} (debido a la vibración del enlace C–O), 1724 cm^{-1} (atribuido al estiramiento del enlace C=O), 1865 cm^{-1} (indicando la vibración simétrica del CH_2) y 2940 cm^{-1} (correspondiente a la vibración asimétrica del enlace CH_2). Mientras que para el PLA los picos característicos se producen a aproximadamente 1090 cm^{-1} (correspondiente a la vibración del enlace C–O–C), 1180 cm^{-1} (correspondiente a la vibración del grupo éster), 1360 cm^{-1} (asignado al grupo C–H), 1450 cm^{-1} (indicando la presencia de CH_3) y 1750 cm^{-1} (debido a la vibración del grupo funcional éster).

Los cambios en la intensidad de los picos pueden verse en las Fig. 4.1-4.4, los que han disminuido en la semana 12 en comparación con la semana 0 indican la presencia de degradación, así como el aumento de intensidad de los picos correspondientes al ácido carboxílico (entre 1700 y 1725cm^{-1}) y alcohol (entre 3200 y 3600cm^{-1}), que son subproductos de la reacción. En el apéndice A figuran tablas comparativas de la disminución de intensidad de cada polímero. En el caso del PCL 150mg/ml , en todos los picos característicos mencionados anteriormente, su degradación en el m-SBF fue la más significativa, reflejando una mayor disminución de la intensidad correspondiente al enlace éster (1750cm^{-1}). Por otra parte, el medio que sufrió la menor degradación fue DMEM, que experimentó la menor reducción de la absorbancia.

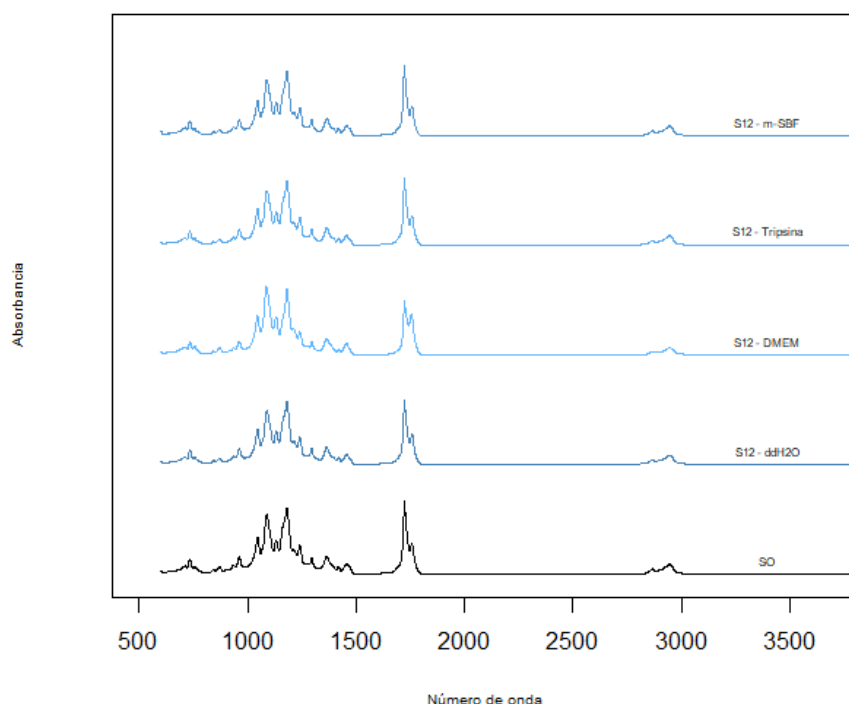


Figura 4.2: Análisis de la estructura química de andamios de PCL/PLA $100/50\text{mg/ml}$ antes y después de la degradación por 12 semanas.

Para la solución polimérica del PCL/PLA $100/50\text{mg/ml}$ (Fig. 4.2), los picos característicos de menor número de onda correspondientes al PLA (1087cm^{-1} y 1180cm^{-1}) fueron más atenuados en el agua destilada, mientras que en el DMEM la influencia sobre la intensidad fue insignificante. El DMEM mostró la mayor disminución de la absorbancia para el grupo éster, un aumento de la intensidad del ácido carboxílico y, en consecuencia, presentó el mayor nivel de degradación.

PCL/PLA $75/75\text{mg/ml}$ Las muestras que se degradaron en m-SBF y tripsina presentaron la disminución más significativa de la intensidad de los enlaces éster y un aumento de la absorbancia correspondiente al ácido carboxílico (Fig. 4.3). Por último, según el análisis FTIR, los andamios de PCL/PLA $50/100\text{mg/ml}$ presentan el mayor nivel de degradación. Esto es evidente tanto por el aumento significativo de la intensidad, que indica la presencia de ácido carboxílico, como por la disminución sustancial de la intensidad correspondiente a los grupos éster. Entre los medios de degradación, el DMEM y la Tripsina tuvieron la mayor influencia (Fig. 4.4). largo de las semanas (Fig. 4.1-4.4).

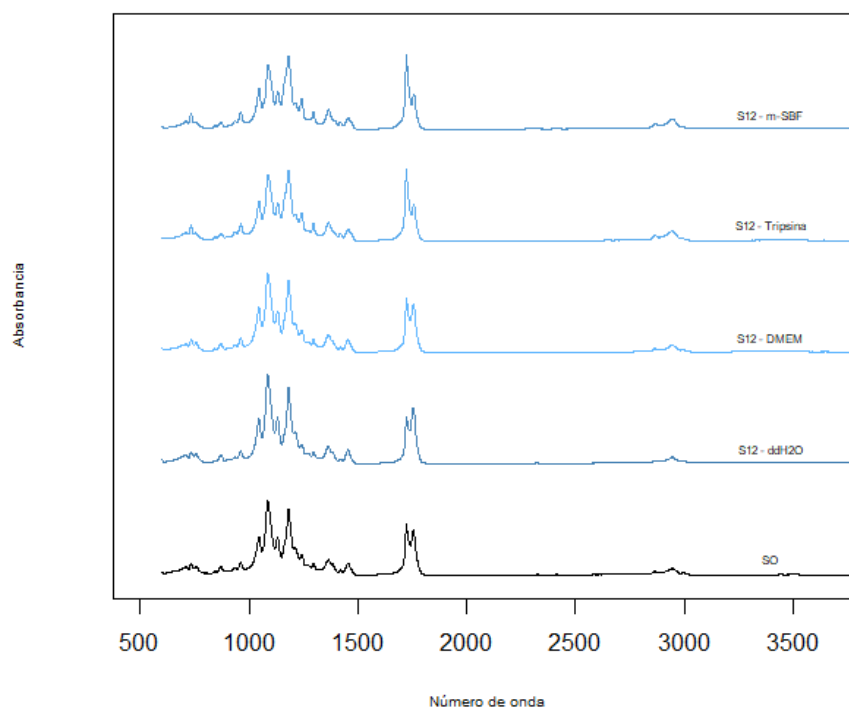


Figura 4.3: Análisis de la estructura química de andamios de PCL/PLA 75/75 mg/ml antes y después de la degradación por 12 semanas.

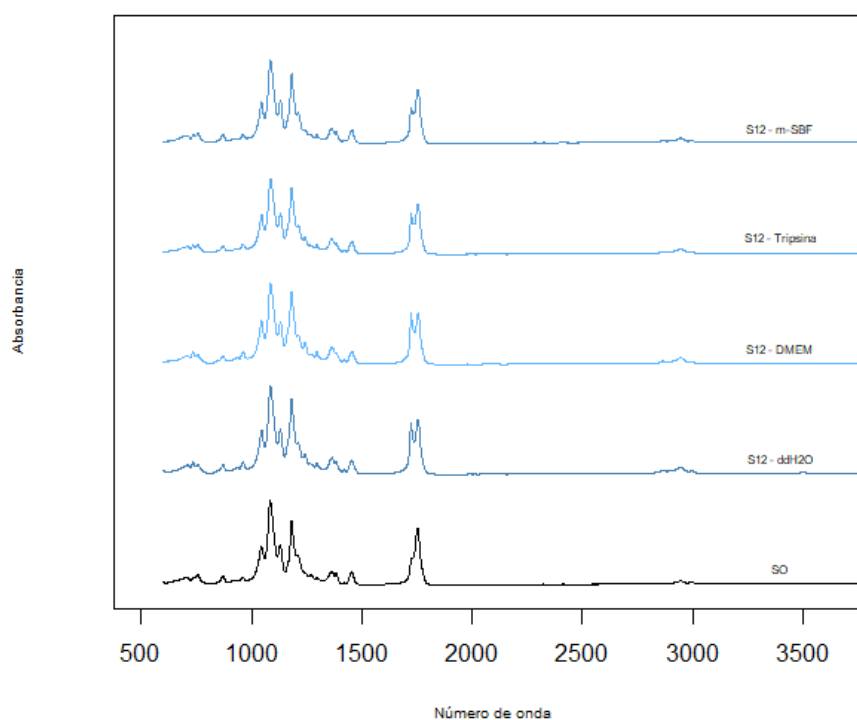


Figura 4.4: Análisis de la estructura química de andamios de PCL/PLA 50/100 mg/ml antes y después de la degradación por 12 semanas.

Lo que se aprecia en los gráficos presentados es que la adición de PLA aumenta la tasa de degradación.

4.2. Microscopio electrónico de barrido

Los andamios, como ya se ha mencionado, se fabricaron mediante electrospinning, siendo sus principales ventajas la creación de fibras con diámetros nanométricos y su elevada relación superficie/volumen. El apéndice B contiene imágenes, a diferentes aumentos, en las que esto es evidente.

Los diámetros obtenidos se presentan como la media, con una incertidumbre representada por la desviación estándar. Estos valores resultaron de la consideración de todas las mediciones de diámetro realizadas en las cinco imágenes de cada una de las tres muestras de cada polímero y medio de degradación, utilizando el software AxioVisio. Por lo tanto, se realizaron manualmente un total aproximado de 1.200 mediciones.

Cuadro 4.1: Diámetro de las fibras a lo largo de las semanas.

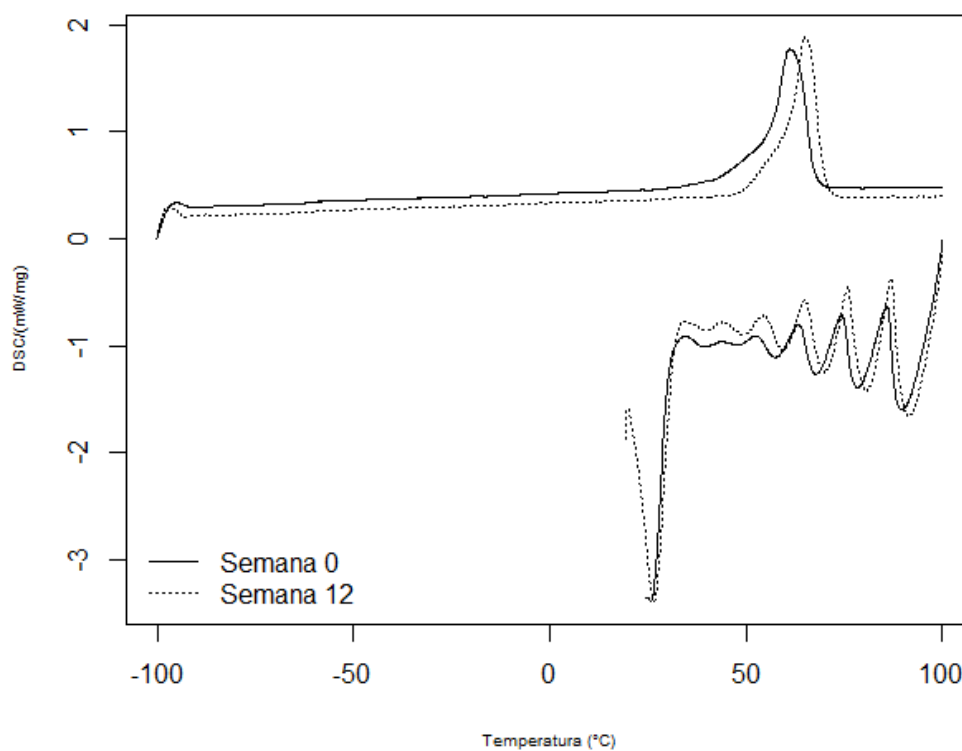
Polímero	Medio	Tiempo (semanas)				
		S0	S3	S6	S9	S12
PCL 150	DMEM	$3,342 \pm 0,453$	$3,035 \pm 0,376$	$3,067 \pm 0,310$	$3,037 \pm 0,307$	$2,974 \pm 0,329$
	m-SBF	$3,342 \pm 0,453$	$2,978 \pm 0,443$	$3,060 \pm 0,307$	$3,042 \pm 0,306$	$2,940 \pm 0,372$
	Tripsina	$3,342 \pm 0,453$	$2,787 \pm 0,530$	$2,740 \pm 0,622$	$3,413 \pm 0,307$	$3,308 \pm 0,338$
	ddH ₂ O	$3,342 \pm 0,453$	$2,862 \pm 0,629$	$2,888 \pm 0,520$	$2,818 \pm 0,521$	$2,960 \pm 0,432$
PCL/PLA 100/50	DMEM	$3,106 \pm 0,366$	$2,998 \pm 0,422$	$2,980 \pm 0,343$	$3,037 \pm 0,307$	$2,922 \pm 0,386$
	m-SBF	$3,106 \pm 0,366$	$3,099 \pm 0,413$	$3,102 \pm 0,524$	$3,237 \pm 0,408$	$3,171 \pm 0,351$
	Tripsina	$3,106 \pm 0,366$	$3,118 \pm 0,485$	$3,130 \pm 0,536$	$3,145 \pm 0,392$	$3,088 \pm 0,438$
	ddH ₂ O	$3,106 \pm 0,366$	$2,921 \pm 0,465$	$2,913 \pm 0,434$	$3,027 \pm 0,366$	$2,833 \pm 0,349$
PCL/PLA 75/75	DMEM	$2,542 \pm 0,556$	$2,422 \pm 0,515$	$2,383 \pm 0,549$	$2,521 \pm 0,452$	$2,503 \pm 0,457$
	m-SBF	$2,542 \pm 0,556$	$2,485 \pm 0,522$	$2,356 \pm 0,577$	$2,628 \pm 0,424$	$2,401 \pm 0,458$
	Tripsina	$2,542 \pm 0,556$	$2,454 \pm 0,535$	$2,493 \pm 0,502$	$2,504 \pm 0,476$	$2,534 \pm 0,385$
	ddH ₂ O	$2,542 \pm 0,556$	$2,262 \pm 0,619$	$2,319 \pm 0,558$	$2,416 \pm 0,563$	$2,410 \pm 0,509$
PCL/PLA 50/100	DMEM	$2,063 \pm 0,685$	$2,393 \pm 0,587$	$2,460 \pm 0,602$	$2,543 \pm 0,600$	$2,647 \pm 0,469$
	m-SBF	$2,063 \pm 0,685$	$2,323 \pm 0,666$	$2,161 \pm 0,725$	$2,427 \pm 0,592$	$2,364 \pm 0,557$
	Tripsina	$2,063 \pm 0,685$	$2,201 \pm 0,645$	$2,312 \pm 0,603$	$2,357 \pm 0,615$	$2,400 \pm 0,537$
	ddH ₂ O	$2,063 \pm 0,685$	$2,464 \pm 0,612$	$2,534 \pm 0,539$	$2,498 \pm 0,510$	$2,589 \pm 0,489$

Se puede observar que, después de la semana doce, con la excepción de PCL/-PLA 50/100 mg/ml, todos los polímeros experimentaron una disminución del diámetro de las fibras (Tabla 4.1). Entre ellos, el PCL/PLA 75/75 mg/ml mostraron el menor cambio en todas las condiciones de degradación, mientras que el PCL 150 mg/ml experimentó una disminución más notable. Además, puede observarse que el medio de degradación que tuvo la mínima influencia en el diámetro fue la tripsina, cuyos efectos fueron menos significativos. También se observa que los polímeros con mayor proporción de PLA presentaron mayores desviaciones estándar, lo que indica que el tamaño de la fibra no es tan uniforme en comparación con los otros casos. Por otro lado, el hecho de que el comportamiento en el cambio de diámetro no sea consistente a lo largo de las semanas podría sugerir la necesidad de trabajar durante un periodo de tiempo más largo para identificar una tendencia clara y obtener información más detallada sobre las variaciones o hacerlo aplicando algún método más automatizado.

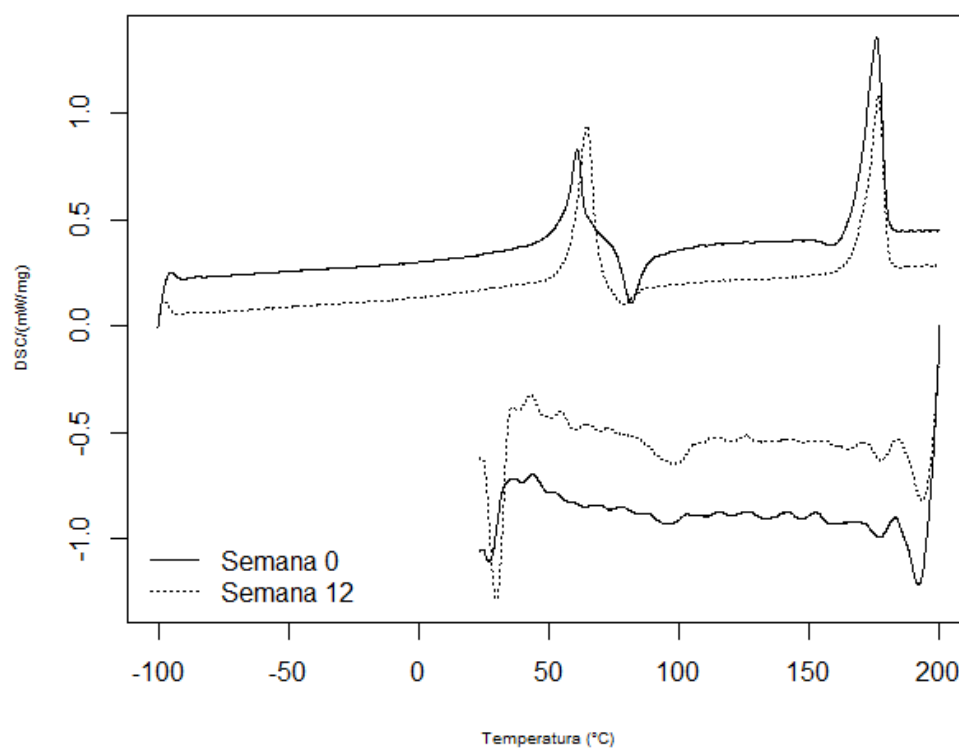
4.3. Calorímetro diferencial de barrido

Las mayores diferencias resultantes de los gráficos DSC (Fig. 4.5 - 4.8) se encuentran entre el PCL 150 mg/ml y el PCL/PLA 50/100 mg/ml y, por lo tanto, se

presentan para todos los medios de degradación. Para el resto de los polímeros, se presentan en el Apéndice C.

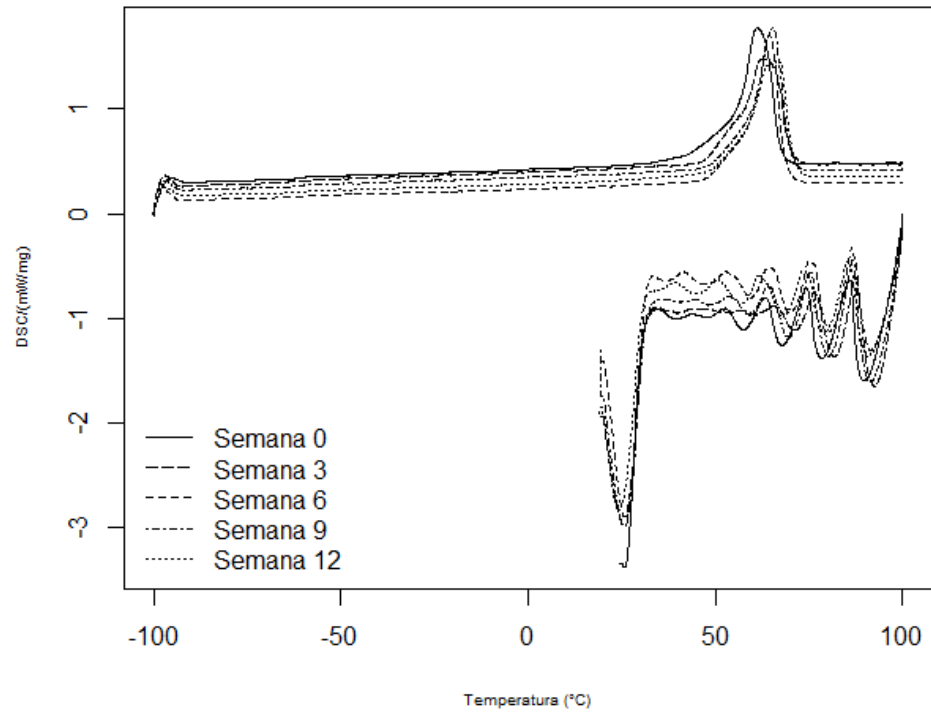


(a) PCL 150 mg/ml.

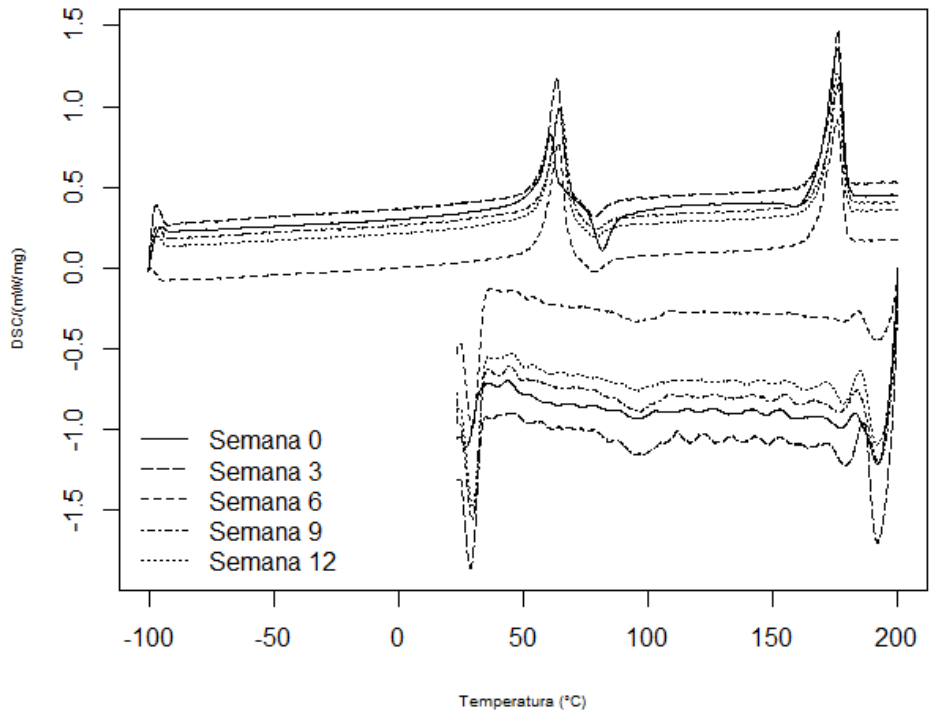


(b) PCL/PLA 50/100 mg/ml.

Figura 4.5: Resultados del DSC para el agua destilada.

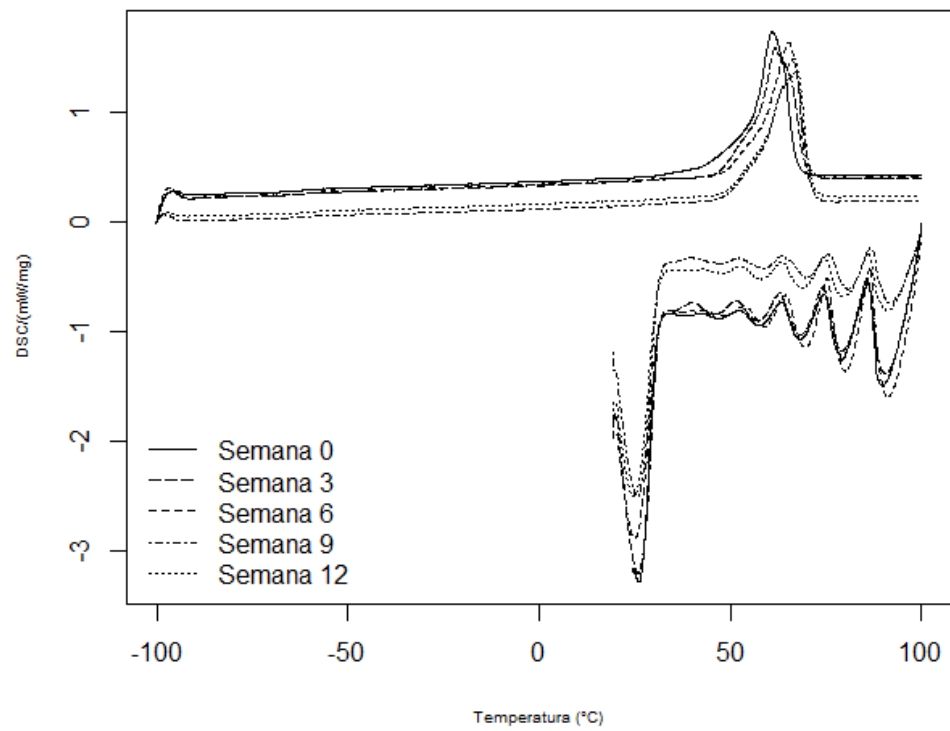


(a) PCL 150 mg/ml.

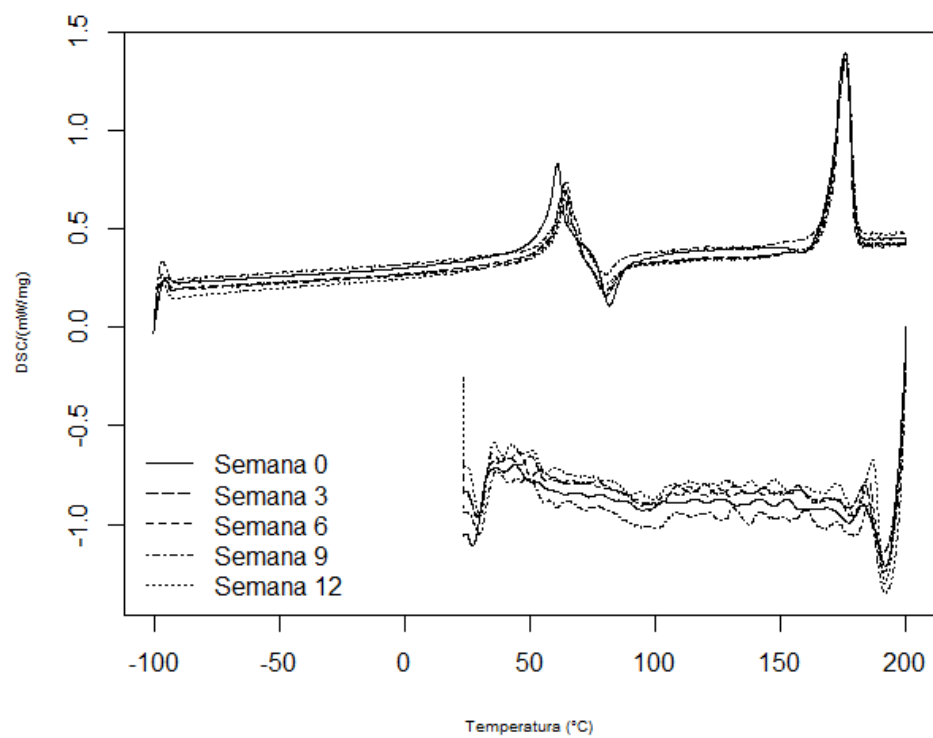


(b) PCL/PLA 50/100 mg/ml.

Figura 4.6: Resultados del DSC para el DMEM.

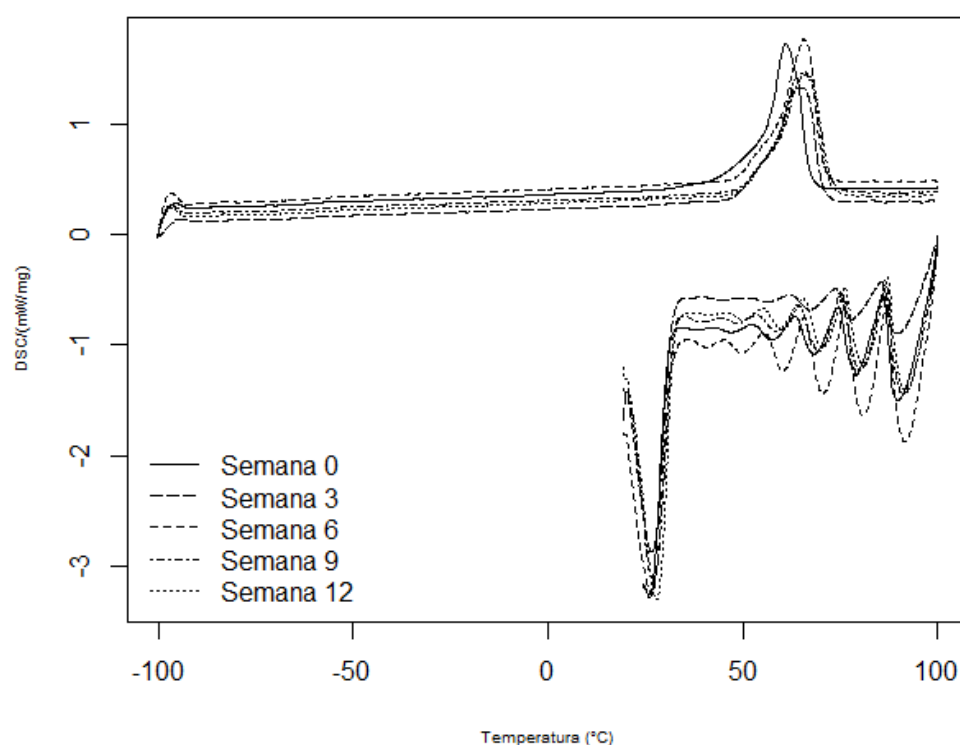


(a) PCL 150 mg/ml.

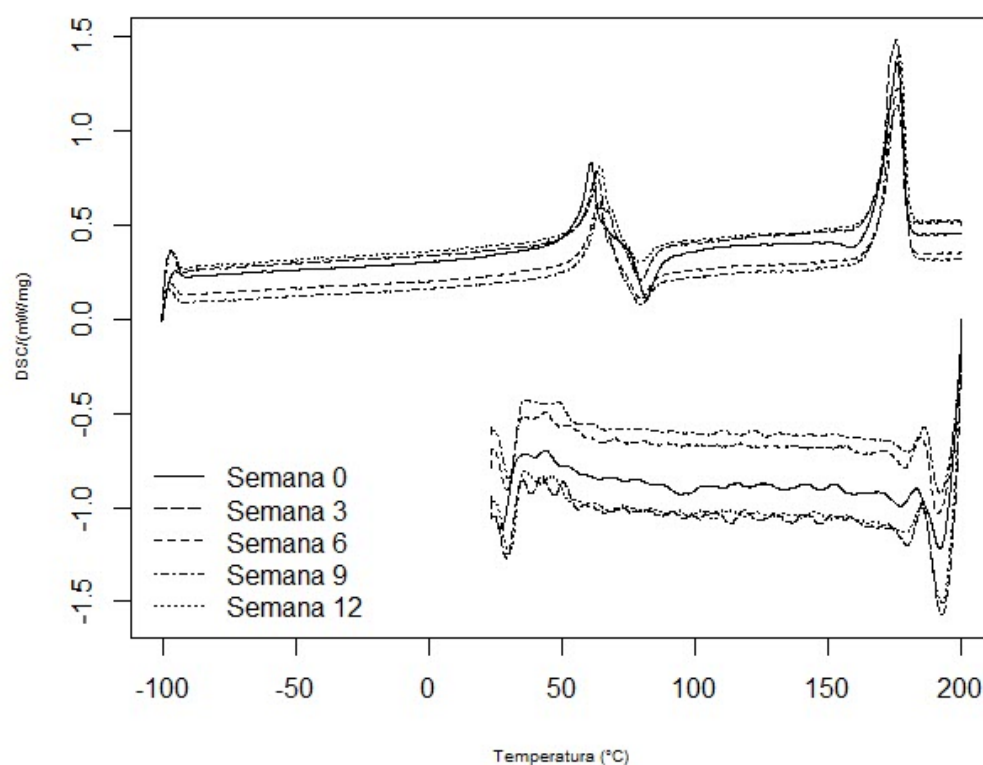


(b) PCL/PLA 50/100 mg/ml.

Figura 4.7: Resultados del DSC para el m-SBF.



(a) PCL 150 mg/ml.



(b) PCL/PLA 50/100 mg/ml.

Figura 4.8: Resultados del DSC para la Tripsina.

Para una mejor interpretación de los gráficos, se ofrece una breve explicación. Las propiedades térmicas se determinan realizando ciclos térmicos, un ciclo de calentamiento (curvas en la parte superior de los gráficos) y un ciclo de enfriamiento (curvas en la parte inferior de los gráficos). Al trazar el flujo de calor en el eje y, los picos ascendentes corresponden a los procesos endotérmicos, como la fusión y la transición vítrea

del material, y los picos descendentes a los procesos exotérmicos, como la cristalización. Los polímeros compuestos de PCL y PLA tienen dos picos de fusión y dos de cristalización, ya que cada uno corresponde a las temperaturas características de cada polímero. También deberían tener dos picos debido a la temperatura de transición vítrea, pero lo que ocurre es que hay un solapamiento entre la transición vítrea del PLA y la fusión del PCL en torno a los 60°C [7].

En esta investigación, los resultados obtenidos indican que la temperatura de fusión del PCL siempre aumenta con el tiempo. Esto podría deberse a los cambios que sufre el polímero durante la degradación en su estructura, en su masa molecular o también a causa de los subproductos resultantes. También se comprobó que cuanto mayor es la cantidad de PLA, menor es la entalpía de fusión del PCL y que ésta aumenta con el paso de las semanas. Por otro lado, en el caso de la entalpía de fusión correspondiente al PLA, ésta aumenta cuanto mayor es la concentración de PLA y, en cuanto al periodo de degradación, su valor aumenta en las primeras etapas pero luego disminuye. Esto puede atribuirse a los cambios en la cristalinidad del polímero. En otras palabras, al principio de la degradación, las regiones amorfas son las más atacadas porque permiten una mayor permeabilidad del agua, lo que genera más espacio disponible y movilidad para el reordenamiento molecular y, en consecuencia, aumenta la cristalinidad. Sin embargo, a continuación, las regiones cristalinas se degradan [9] y, además, la pérdida de peso es considerable, por lo que la disminución de la cristalinidad pasa a ser significativa [5].

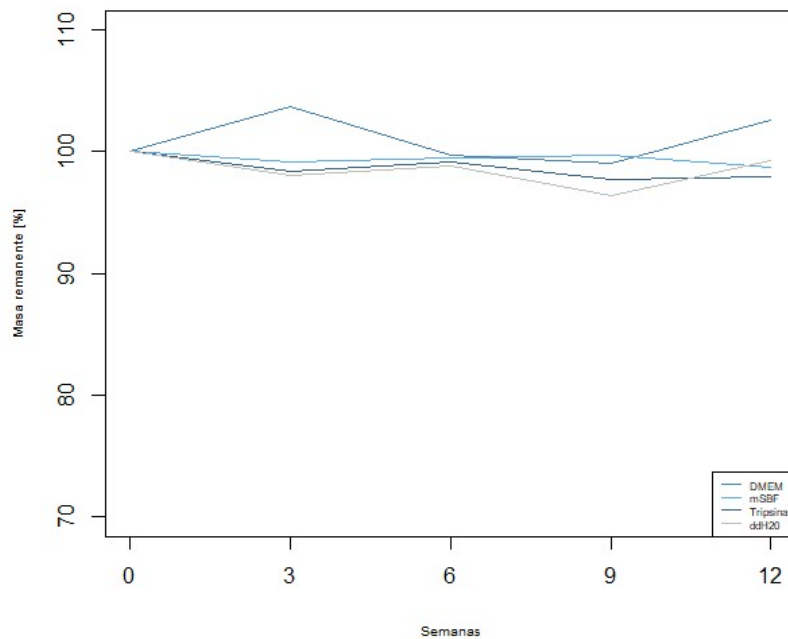
Los demás valores característicos no varían significativamente, sino que oscilan siempre en torno a su valor teórico. MATTA (2014) [19] también comparte que la temperatura de cristalización permanece aproximadamente constante con el contenido de PCL.

4.4. Cambios en la masa

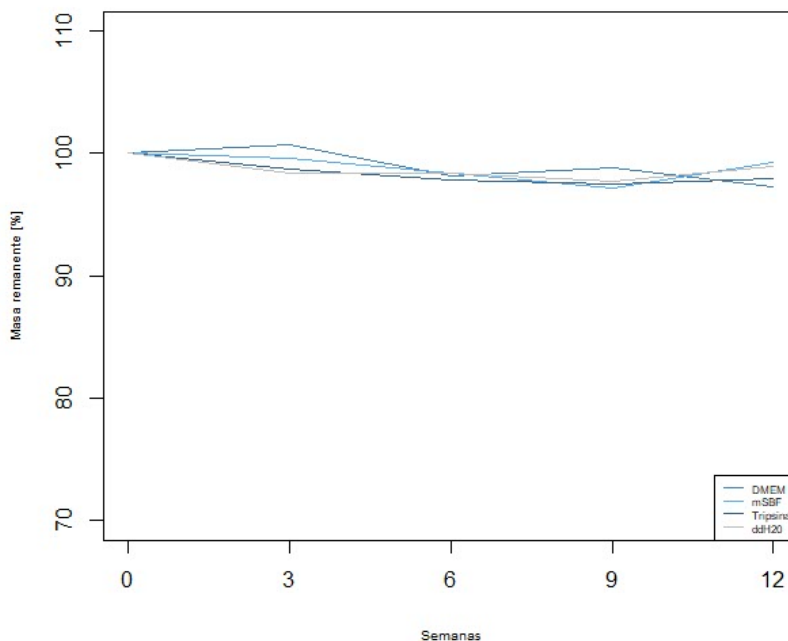
La determinación de la masa remanente de los andamios se lleva a cabo del siguiente modo.

$$Masa\ remanente = \left(1 - \frac{Masa\ inicial - Masa\ final}{Masa\ inicial}\right) \cdot 100 \quad (4.1)$$

Los resultados expresados en los gráficos representan la media de las 3 muestras de cada polímero y sus correspondientes medios de degradación, como muestran las tablas del Apéndice D.

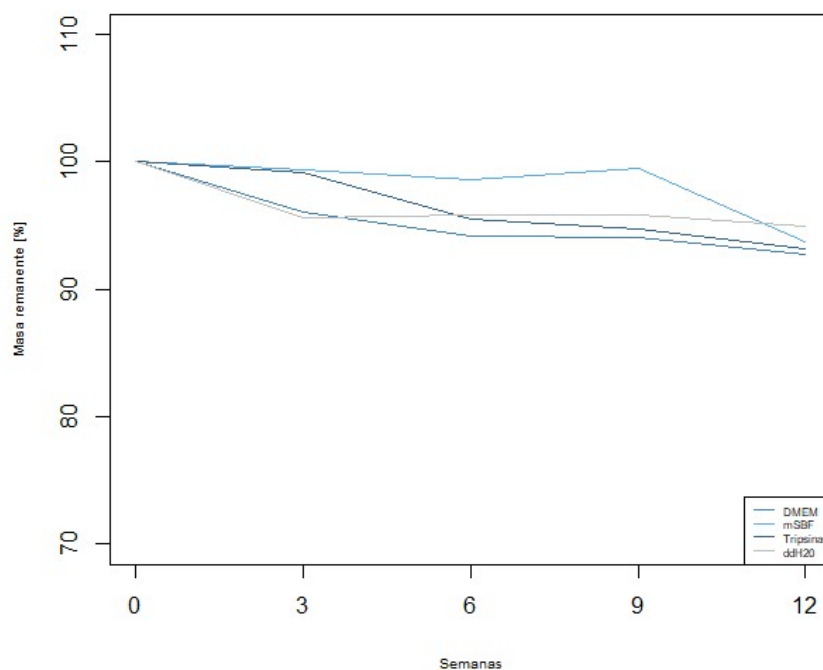


(a) PCL 150 mg/ml.

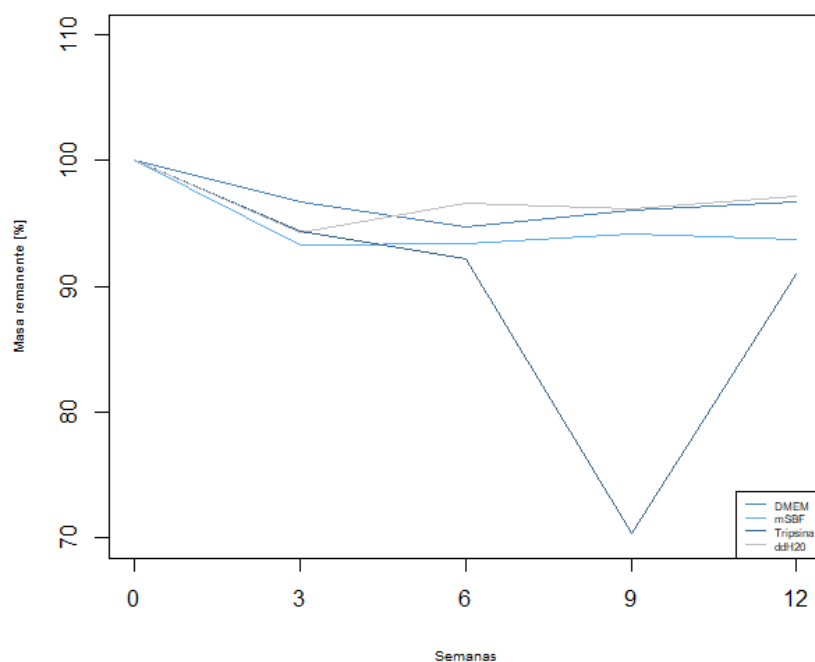


(b) PCL/PLA 100/50 mg/ml.

Figura 4.9: Masa remanente.



(a) PCL/PLA 75/75 mg/ml.



(b) PCL/PLA 50/100 mg/ml.

Figura 4.10: Masa remanente.

En el caso de los polímeros que se incubaron en DMEM, el polímero que sufre una disminución más significativa es siempre es el PCL/PLA 75/75 mg/ml. Por otro lado, en el caso de m-SBF, la que siempre experimenta la mayor pérdida de masa es el PCL/PLA 50/100 mg/ml y lo mismo ocurre para la degradación enzimática. En general, este polímero se degrada en mayor medida y más rápidamente. Esto coincide con los resultados obtenidos por NOFAR (2019) [24], que descubrió que, aunque tanto el PCL como el PLA se hidrolizan muy lentamente, cuanto mayor es la cantidad de PLA se acelera significativamente el proceso de hidrólisis y también aumenta la velo-

cidad de degradación. Mientras que cuanto mayor es la cantidad de PCL, dado que su mayor hidrofobicidad impide una rápida difusión del agua en la matriz, se ralentiza el proceso de degradación. Esto se refleja en la menor pérdida de masa de PCL 150mg/ml en todos los medios de cultivo a lo largo de las 12 semanas.

Por otra parte, entre los medios de degradación, el efecto de la tripsina sobre el PCL/-PLA 50/100mg/ml provoca una degradación más rápida y también produce una mayor pérdida de masa. Esto se atribuye al hecho de que en la hidrólisis la pérdida de peso se produce cuando se alcanza un valor de peso molecular crítico, que para la degradación enzimática es un valor más alto y, por tanto, la pérdida de peso ocurre con mayor rapidez que en el caso hidrolítico [3].

En combinación con los resultados de las gráficas espectroscópicas (Fig. 4.1-4.4), esto concuerda con lo que escribe TSUJI (2000) sobre que la pérdida de masa es un índice del contenido de oligómero (ácido carboxílico, producto de la degradación) soluble en agua y liberado en el medio circundante [26].

5. Conclusiones

Una vez analizados los resultados y las referencias bibliográficas citadas en el capítulo anterior, se puede concluir que la aceleración en la velocidad de degradación es muy clara cuanto mayor es la cantidad de PLA en la solución. Como ya se ha mencionado, esto se debe a que tiene un grado de hidrofobicidad menor que el PCL. En cuanto a los medios de degradación, la degradación enzimática causó la mayor degradación en PCL/PLA 50/100mg/ml. Por otra parte, la incubación en m-SBF influye significativamente en el PCL 150mg/ml, mientras que en DMEM los andamios más degradados fueron los de PCL/PLA 100/50mg/ml.

La comparación de la degradación del PCL y el PLA en distintos medios contribuye a la mejor comprensión del comportamiento de los polímeros en diferentes condiciones y entornos. También puede proporcionar información valiosa sobre la biocompatibilidad de los materiales y su potencial para aplicaciones biomédicas. Así pues, la elección del material dependerá de la aplicación prevista ya que, como se ha comentado anteriormente, el proceso de degradación estará en función del tipo de fluido circundante, el tiempo de regeneración del tejido y la finalidad del andamio. Por ejemplo, PCL 150 mg/ml, , debido a su lenta tasa de degradación, podría utilizarse para implantes necesarios durante un largo período o para un soporte de administración de fármacos a largo plazo, mientras que el PCL/PLA 50/100mg/ml sería más adecuado para un implante de tejido cutáneo.

Referencias

- [1] A.F. Vieira. "Water Degradation Study of Aliphatic Polyesters". En: *Journal of Applied Polymer Science* (1993). DOI: <https://doi.org/10.1002/app.1993.070481110>.
- [2] Lijian Liu y Suming Li. *Biomacromolecules*. 2000, págs. 350-359. DOI: <https://doi.org/10.1021/bm000046k>.
- [3] Jianzhong Bei Qing Cai Guixin Shi y Shenguo Wang. "Enzymatic degradation behavior and mechanism of Poly(lactide-co-glycolide) foams by trypsin". En: *ElSevier* (2002). DOI: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00377-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00377-0).
- [4] Ayako Oyane. "Preparation and assessment of revised simulated body fluids". En: *Journal of Biomedical Materials Research Part A* (2003). DOI: [10.1002/jbm.a.10482](https://doi.org/10.1002/jbm.a.10482).
- [5] Helena S. Azevedo y Rui L. Reis. *Understanding the enzymatic degradation of biodegradable polymers and strategies to control their degradation rate*. 2004, págs. 177-197. DOI: [10.1201/9780203491232.ch12](https://doi.org/10.1201/9780203491232.ch12).
- [6] Hak-Joon Sung. "The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis". En: *ElSevier* (2004). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.07.050>.
- [7] N. López-Rodríguez. "Crystallization, morphology, and mechanical behavior of polylactide/poly (-caprolactone) blends". En: *Polymer Engineering Science* (2006). DOI: [10.1002/pen.20609](https://doi.org/10.1002/pen.20609).
- [8] Yutaka Tokiwa. "Biodegradability and biodegradation of poly(lactide)". En: *Springer* (2006). DOI: [10.1007/s00253-006-0488-1](https://doi.org/10.1007/s00253-006-0488-1).
- [9] L. Avérous. *Monomers, Polymers and Composites from Renewables Resources*. ElSevier, 2008, págs. 433-450. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045316-3.00021-1>.
- [10] Joachim H. Wendorff Seema Agarwal y Andreas Greiner. *Polymer*. Vol. 49. ElSevier, 2008, págs. 5603-5621. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.09.014>.
- [11] Nandana Bhardwaj y Subhas C. Kundu. "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique". En: *ElSevier* (2010). DOI: [10.1016/j.biotechadv.2010.01.004](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004).
- [12] International Organization for Standardization (ISO). *ISO 10993-13. Biological evaluation of medical devices*. 2010.
- [13] A.C.Vieira y J.C.Vieira. *Mechanical study of PLA-PCL fibers during in vitro degradation*. ElSevier, 2011, págs. 451-460. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2010.12.006>.
- [14] Naznin Sultana y Mohammed Rafiq Abdul Kadir. "Study of in vitro degradation of biodegradable polymer based thin films and tissue engineering scaffolds". En: *Academic Journals* (2011). DOI: [10.5897/AJB11.2742](https://doi.org/10.5897/AJB11.2742).
- [15] Mashiur Rahman. *Polyester*. Springer, 2012, págs. 99-132. DOI: [http://dx.doi.org/10.5772/47765](https://doi.org/10.5772/47765).
- [16] International Organization for Standardization (ISO). *ISO 10993-12. Biological evaluation of medical devices*. 2012.
- [17] Yuksel Guvenilir. "Comparing the In-Vitro Biodegradation Kinetics of Commercial and Synthesized Polycaprolactone Films in Different Enzyme Solutions". En: *Ekoloji* (2013). DOI: [10.1080/09205063.2016.1177277](https://doi.org/10.1080/09205063.2016.1177277).
- [18] Zhenyu Li y Ce Wang. *One-Dimensional Nanostructures. Electrospinning technique and Unique Nanofibers*. Springer, 2013. DOI: [10.1007/978-3-642-36427-3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-36427-3).
- [19] A.K.Matta. "Preparation and Characterization of Biodegradable PLA/PCL Polymeric Blends". En: *Journal of Polymers and the Environment* (2014). DOI: [http://dx.doi.org/10.1007/s10924-012-0413-1](https://doi.org/10.1007/s10924-012-0413-1).

- [20] Chi Zhang. *Biodegradable Polyesters*. Stoyko Fakirov, 2015, págs. 1-24. DOI: [10.1002/9783527656950](https://doi.org/10.1002/9783527656950).
- [21] Lil Mim Mim y Naznin Sultana. "Comparison on in vitro degradation of Polycaprolactone and Polycaprolactone/gelatin nanofibrous scaffold". En: *Malaysian Journal of Analytical Sciences* (2017). DOI: <https://doi.org/10.17576/mjas-2017-2103-12>.
- [22] Bahareh Azimi y Parviz Nourpanah. "Poly (-caprolactone) Fiber: An Overview". En: *Sage Journal of Reinforced Plastics and Composites* (2018). DOI: <https://doi.org/10.1177/0731684418757975>.
- [23] Aishwarya Kulkarni y Dasari Harshini. "Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications". En: *Drug Design, Development and Therapy* (2018). DOI: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S165440>.
- [24] Mohammadreza Nofar. "Poly (lactic acid) blends: Processing, properties and applications". En: *ElSevier* (2018). DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2018.12.002](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.002).
- [25] Richard Song. "Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications". En: *Drug Design, Development and Therapy* (2018). DOI: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S165440>.
- [26] Hideto Tsuji y Yoshito Ikada. "Current Status of Methods Used In Degradation of Polymers: A Review". En: *MATEC Web of Conferences* (2018). DOI: [10.1051/mateconf/201714402023](https://doi.org/10.1051/mateconf/201714402023).
- [27] Diana Marcela Villalobos Vega. *Caracterización y biocompatibilidad de un andamio de ácido poliláctico fabricado por medio de impresión 3D*. 2018.
- [28] Lindsay N. Woodard y Melissa A. Grunlan. "Hydrolytic Degradation and Erosion of Polyester Bio-materials". En: *Journal of Applied Polymer Science* (2018). DOI: <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.8b00424>.
- [29] Muñoz Prieto Lizarazo-Fonseca y Vera Graziano. *Andamios eletrohilados de poli(-caprolactona)/colágeno con uso potencial en regeneración de tejido cutáneo*. Vol. 10. 2019, págs. 197-208. DOI: <https://doi.org/10.19053/01217488.v10.n2.2019.9841>.
- [30] Shujun Cao. "New perspectives: In-situ tissue engineering for bone repair scaffold". En: *ElSevier* (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2020.108445>.
- [31] Charles Owen Smith. "Energy Metabolism During Osteogenic Differentiation: The Role of Akt". En: *PubMed* (2020). DOI: [10.1089/scd.2020.0141](https://doi.org/10.1089/scd.2020.0141).
- [32] María Camila Puentes Tapia. *Propiedades, Métodos de Síntesis y Aplicaciones de la Policaprolactona*. 2020.
- [33] Louis Gangolphe y Christopher Y. Leon-Valdivieso. "Electrospun microstructured PLA-based scaffolds featuring relevant anisotropic, mechanical and degradation characteristics for soft tissue engineering". En: *ElSevier* (2021). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112339>.
- [34] Ya Li. "Developments of Advanced Electrospinning Techniques: A Critical Review". En: *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* (2021). DOI: <https://doi.org/10.1002/admt.202100410>.
- [35] NETZSCH Instruments North America. *DSC Analysis of Polymers*. URL: https://www.youtube.com/watch?v=s9ah7DUL-es&ab_channel=NETZSCHInstrumentsNorthAmericaLLC.
- [36] METTLER TOLEDO AutoChem. *Espectroscopia infrarroja de Fourier (FTIR) para su aplicación*. URL: https://www.youtube.com/watch?v=PgXbC16Pt5M&ab_channel=METTLERTOLED0AutoChem.
- [37] ROTH. *ROTI Cell DMEM High Glucose*. URL: <https://www.carlroth.com/de/en/media-solutions-for-cell-culture/roticell-dmem-high-glucose/p/9007.1>.

Apéndice

A. Resultados FTIR

Cuadro A.1: Disminución de la intensidad en PCL 150 mg/ml.

Medio de degradación	No. de onda (cm ⁻¹)	Tiempo (semanas)		Disminución de intensidad (%)
		S0	S12	
ddH ₂ O	1047	0.2232	0.2217	0.67 %
DMEM	1047	0.2232	0.2220	0.56 %
m-SBF	1047	0.2232	0.1838	17.69 %
Tripsina	1047	0.2232	0.2215	9.74 %
ddH ₂ O	1239	0.3193	0.3062	4.10 %
DMEM	1239	0.3193	0.3093	3.13 %
m-SBF	1239	0.3193	0.2554	20.01 %
Tripsina	1239	0.3193	0.2852	10.68 %
ddH ₂ O	1722	0.7316	0.6562	10.32 %
DMEM	1722	0.7316	0.6600	9.78 %
m-SBF	1722	0.7316	0.5310	27.43 %
Tripsina	1722	0.7316	0.6213	15.08 %
ddH ₂ O	2866	0.0690	0.0745	-7.98 %
DMEM	2866	0.0690	0.0687	0.5 %
m-SBF	2866	0.0690	0.0623	9.76 %
Tripsina	2866	0.0690	0.0682	1.15 %
ddH ₂ O	2945	0.1126	0.1101	2.15 %
DMEM	2945	0.1126	0.1107	1.65 %
m-SBF	2945	0.1126	0.0933	17.12 %
Tripsina	2945	0.1126	0.1048	6.94 %

Cuadro A.2: Disminución de la intensidad en PCL/PLA 100/50 mg/ml.

Medio de degradación	No. de onda (cm ⁻¹)	Tiempo (semanas)		Disminución de intensidad (%)
		S0	S12	
ddH ₂ O	1087	0.3846	0.3499	9.03 %
DMEM	1087	0.3846	0.4398	-14.34 %
m-SBF	1087	0.3846	0.3620	5.87 %
Tripsina	1087	0.3846	0.3581	6.89 %
ddH ₂ O	1180	0.4262	0.4033	5.36 %
DMEM	1180	0.4262	0.4231	0.72 %
m-SBF	1180	0.4262	0.4145	2.74 %
Tripsina	1180	0.4262	0.4162	2.35 %
ddH ₂ O	1240	0.1939	0.1831	5.56 %
DMEM	1240	0.1939	0.1559	19.58 %
m-SBF	1240	0.1939	0.1871	3.48 %
Tripsina	1240	0.1939	0.1898	2.10 %
ddH ₂ O	1361	0.1176	0.1157	1.58 %
DMEM	1361	0.1176	0.1141	2.91 %
m-SBF	1361	0.1176	0.1167	0.71 %
Tripsina	1361	0.1176	0.1172	0.29 %
ddH ₂ O	1457	0.0770	0.0748	2.80 %
DMEM	1457	0.0770	0.0834	-8.40 %
m-SBF	1457	0.0770	0.0759	1.31 %
Tripsina	1457	0.0770	0.0739	3.93 %
ddH ₂ O	1723	0.4680	0.4192	10.44 %
DMEM	1723	0.4680	0.3498	25.26 %
m-SBF	1723	0.4680	0.4518	3.46 %
Tripsina	1723	0.4680	0.4386	6.28 %
ddH ₂ O	1757	0.2029	0.2029	-0.02 %
DMEM	1757	0.2029	0.2641	-30.17 %
m-SBF	1757	0.2029	0.1989	1.97 %
Tripsina	1757	0.2029	0.1994	1.70 %
ddH ₂ O	2866	0.0442	0.0444	-0.47 %
DMEM	2866	0.0442	0.0360	18.56 %
m-SBF	2866	0.0442	0.0471	-6.44 %
Tripsina	2866	0.0442	0.0459	-3.79 %
ddH ₂ O	2945	0.0735	0.0714	2.93 %
DMEM	2945	0.0735	0.0600	18.38 %
m-SBF	2945	0.0735	0.0750	-2.05 %
Tripsina	2945	0.0735	0.0741	-0.77 %

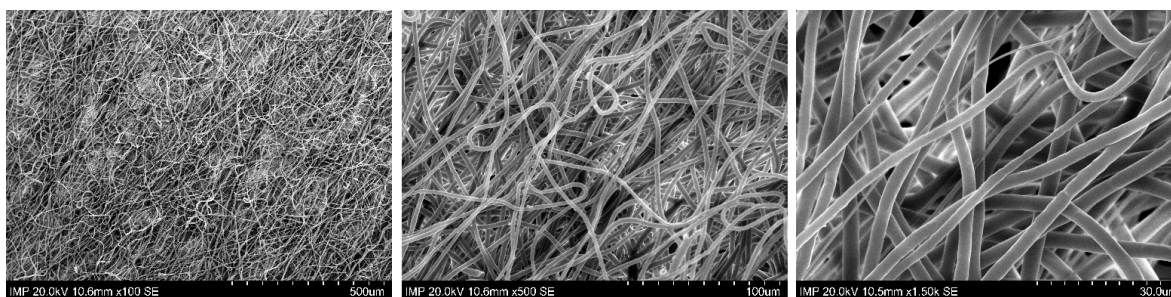
Cuadro A.3: Disminución de la intensidad en PCL/PLA 75/75 mg/ml.

Medio de degradación	No. de onda (cm ⁻¹)	Tiempo (semanas)		Disminución de intensidad (%)
		S0	S12	
ddH ₂ O	1085	0.4208	0.5018	-19.27 %
DMEM	1085	0.4208	0.4461	-6.03 %
m-SBF	1085	0.4208	0.3617	14.03 %
Tripsina	1085	0.4208	0.3731	11.34 %
ddH ₂ O	1181	0.3751	0.4353	-16.06 %
DMEM	1181	0.3751	0.4096	-9.21 %
m-SBF	1181	0.3751	0.4184	-11.55 %
Tripsina	1181	0.3751	0.4044	-7.82 %
ddH ₂ O	1241	0.1235	0.1198	3 %
DMEM	1241	0.1235	0.1372	-11.08 %
m-SBF	1241	0.1235	0.1821	-47.41 %
Tripsina	1241	0.1235	0.1686	-36.48 %
ddH ₂ O	1365	0.0964	0.1041	-7.96 %
DMEM	1365	0.0964	0.1078	-11.78 %
m-SBF	1365	0.0964	0.1235	-28.07 %
Tripsina	1365	0.0964	0.1174	-21.73 %
ddH ₂ O	1455	0.0772	0.0885	-14.57 %
DMEM	1455	0.0772	0.0819	-6.03 %
m-SBF	1455	0.0772	0.0741	4 %
Tripsina	1455	0.0772	0.0752	2.65 %
ddH ₂ O	1723	0.2937	0.2719	7.44 %
DMEM	1723	0.2937	0.3144	-7.04 %
m-SBF	1723	0.2937	0.4233	-44.11 %
Tripsina	1723	0.2937	0.4093	-39.36 %
ddH ₂ O	1755	0.2601	0.3218	-23.72 %
DMEM	1755	0.2601	0.2776	-6.73 %
m-SBF	1755	0.2601	0.2030	21.96 %
Tripsina	1755	0.2601	0.2096	19.42 %
ddH ₂ O	2865	0.0316	0.0440	-39.31 %
DMEM	2865	0.0316	0.0324	-2.68 %
m-SBF	2865	0.0316	0.0460	-45.74 %
Tripsina	2865	0.0316	0.0440	-39.31 %
ddH ₂ O	2945	0.0503	0.0485	3.66 %
DMEM	2945	0.0503	0.0536	-6.60 %
m-SBF	2945	0.0503	0.0733	-45.79 %
Tripsina	2945	0.0503	0.0690	-37.21 %

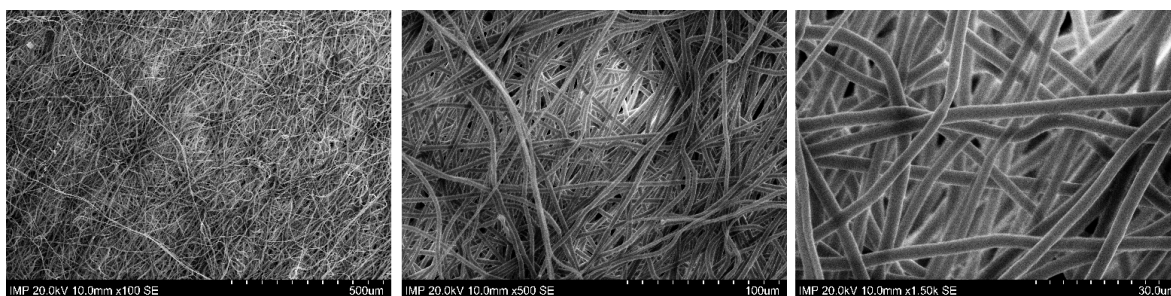
Cuadro A.4: Disminución de la intensidad en PCL/PLA 50/100 mg/ml.

Medio de degradación	No. de onda (cm ⁻¹)	Tiempo (semanas)		Disminución de intensidad (%)
		S0	S12	
ddH ₂ O	1084	0.4726	0.4931	-4.33 %
DMEM	1084	0.4726	0.4470	5.42 %
m-SBF	1084	0.4726	0.4675	1.08 %
Tripsina	1084	0.4726	0.4201	11.11 %
ddH ₂ O	1181	0.3608	0.4255	-17.93 %
DMEM	1181	0.3608	0.4085	-13.11 %
m-SBF	1181	0.3608	0.3919	-8.62 %
Tripsina	1181	0.3608	0.3724	-3.20 %
ddH ₂ O	1360	0.0809	0.1008	-24.48 %
DMEM	1360	0.0809	0.0997	-23.12 %
m-SBF	1360	0.0809	0.0931	-15.01 %
Tripsina	1360	0.0809	0.0918	-13.48 %
ddH ₂ O	1453	0.0819	0.0869	-6.16 %
DMEM	1453	0.0819	0.0804	1.86 %
m-SBF	1453	0.0819	0.0839	-2.46 %
Tripsina	1453	0.0819	0.0781	4.63 %
ddH ₂ O	1724	0.1506	0.2914	-93.52 %
DMEM	1724	0.1506	0.2892	-92.06 %
m-SBF	1724	0.1506	0.2071	-37.56 %
Tripsina	1724	0.1506	0.2312	-53.52 %
ddH ₂ O	1752	0.3205	0.3033	5.36 %
DMEM	1752	0.3205	0.2806	12.45 %
m-SBF	1752	0.3205	0.3059	4.53 %
Tripsina	1752	0.3205	0.2766	13.69 %
ddH ₂ O	2945	0.0344	0.0530	-54.23 %
DMEM	2945	0.0344	0.0496	-44.39 %
m-SBF	2945	0.0344	0.0429	-24.82 %
Tripsina	2945	0.0344	0.0423	-23.09 %

B. Resultados SEM

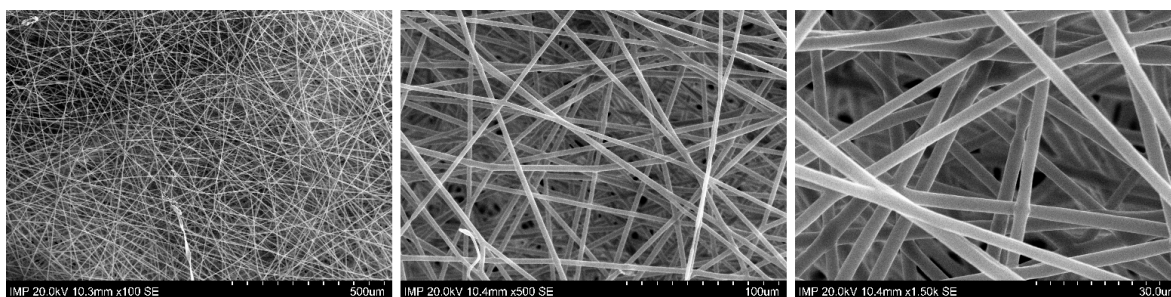


(a) Semana 0.

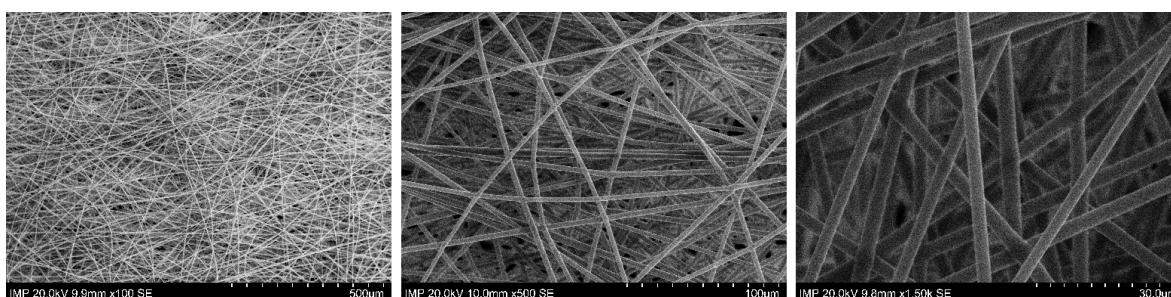


(b) Semana 12 luego de la degradación en m-SBF.

Figura B.1: PCL 150 mg/ml en diferentes magnificaciones: 100x, 500x, 1500x.

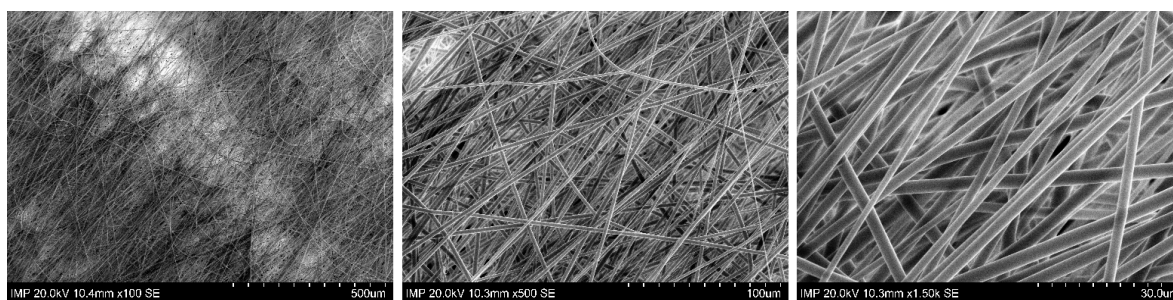


(a) Semana 0.

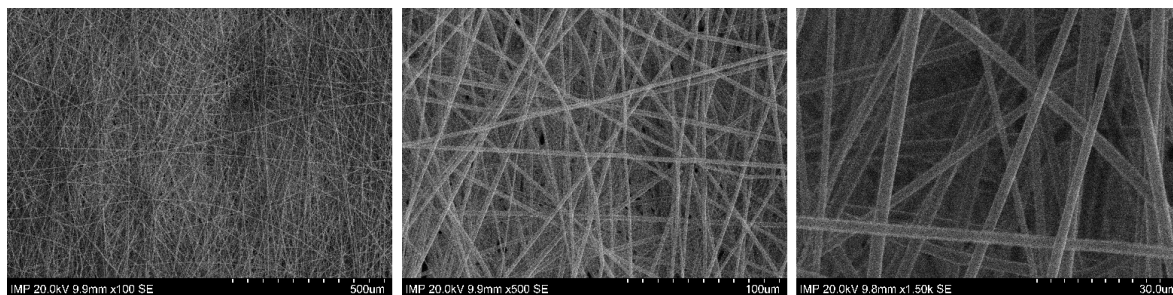


(b) Semana 12 luego de la degradación en m-SBF.

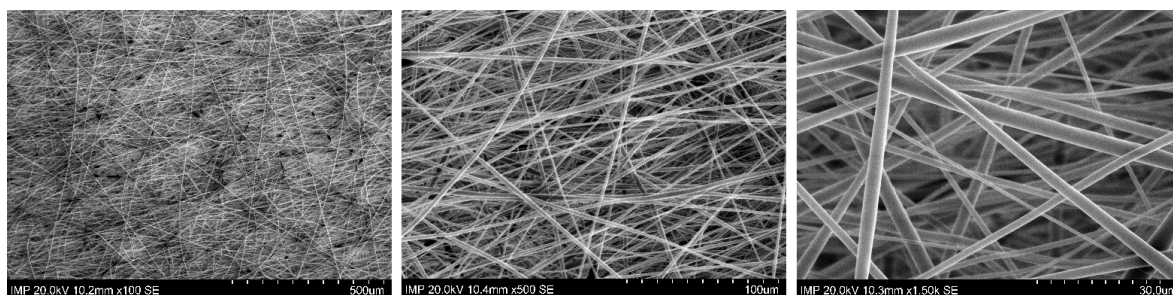
Figura B.2: PCL/PLA 100/50 mg/ml en diferentes magnificaciones: 100x, 500x, 1500x.



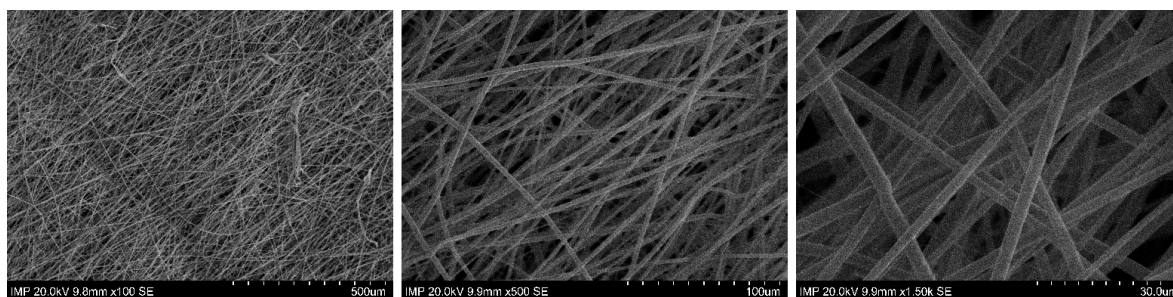
(a) Semana 0.



(b) Semana 12 luego de la degradación en m-SBF.

Figura B.3: PCL/PLA 75/75 mg/ml en diferentes magnificaciones: 100x, 500x, 1500x.

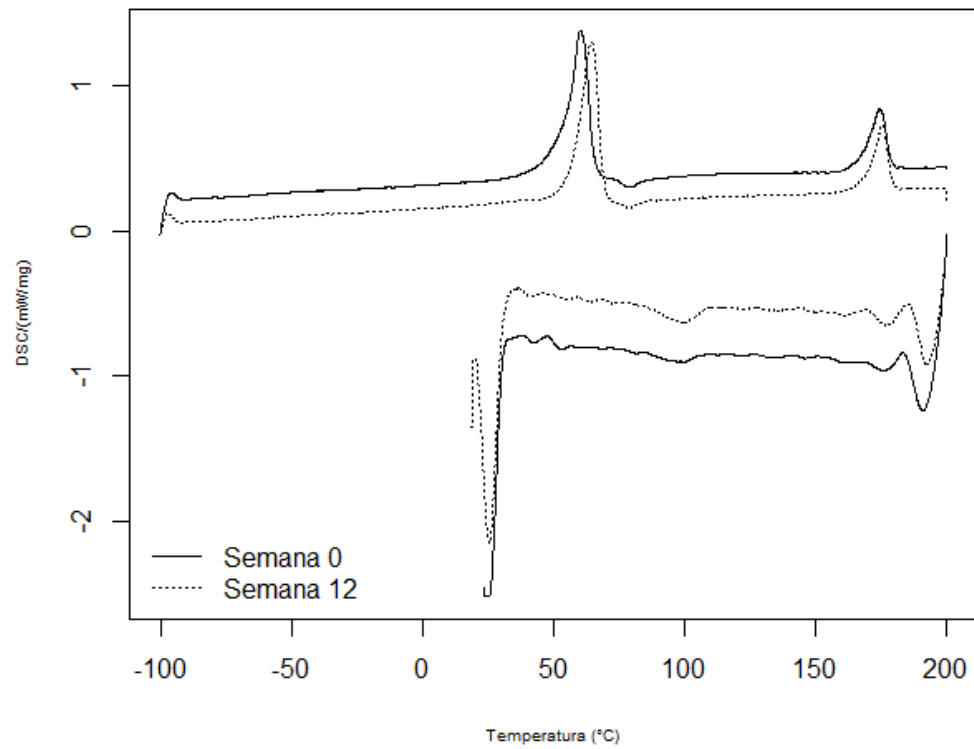
(a) Semana 0.



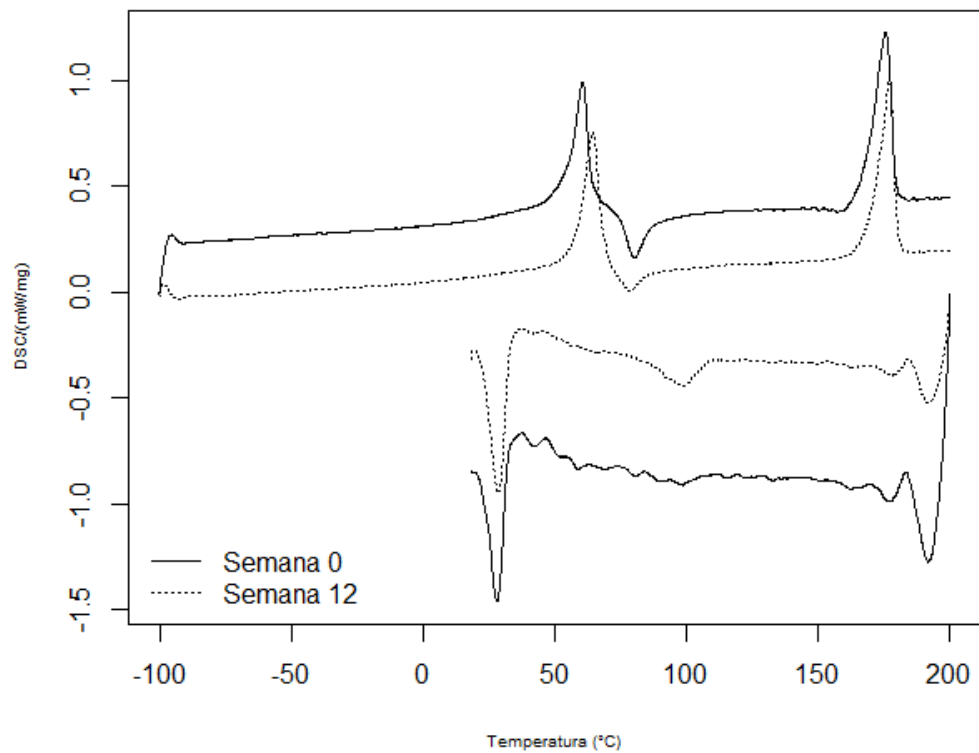
(b) Semana 12 luego de la degradación en m-SBF.

Figura B.4: PCL/PLA 50/100 mg/ml en diferentes magnificaciones: 100x, 500x, 1500x.

C. Resultados DSC

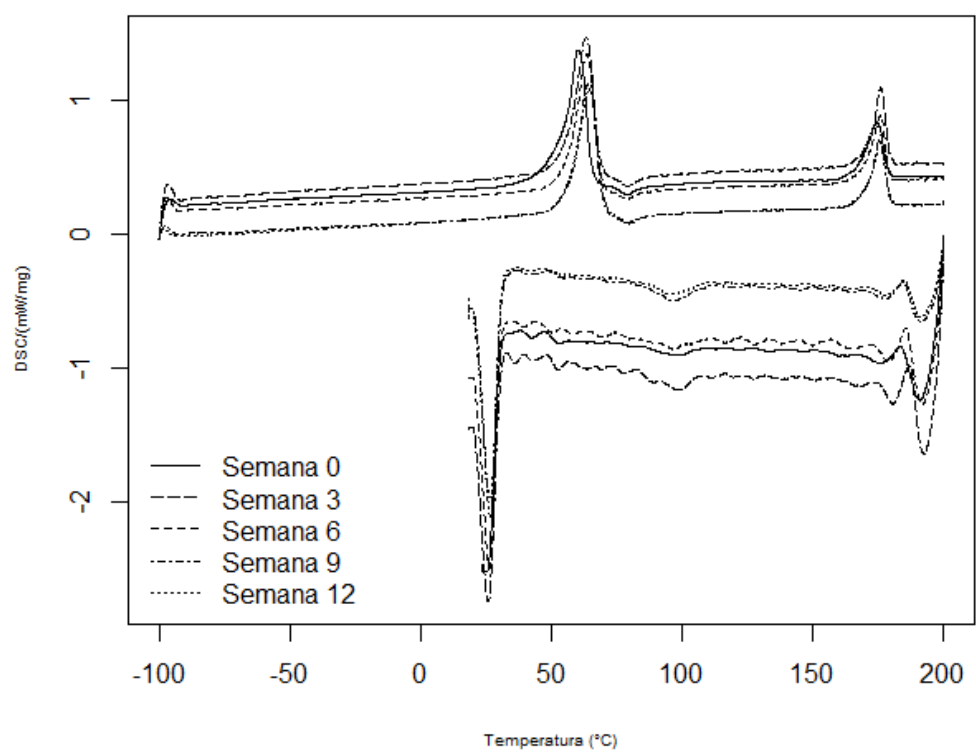


(a) PCL/PLA 100/50 mg/ml.

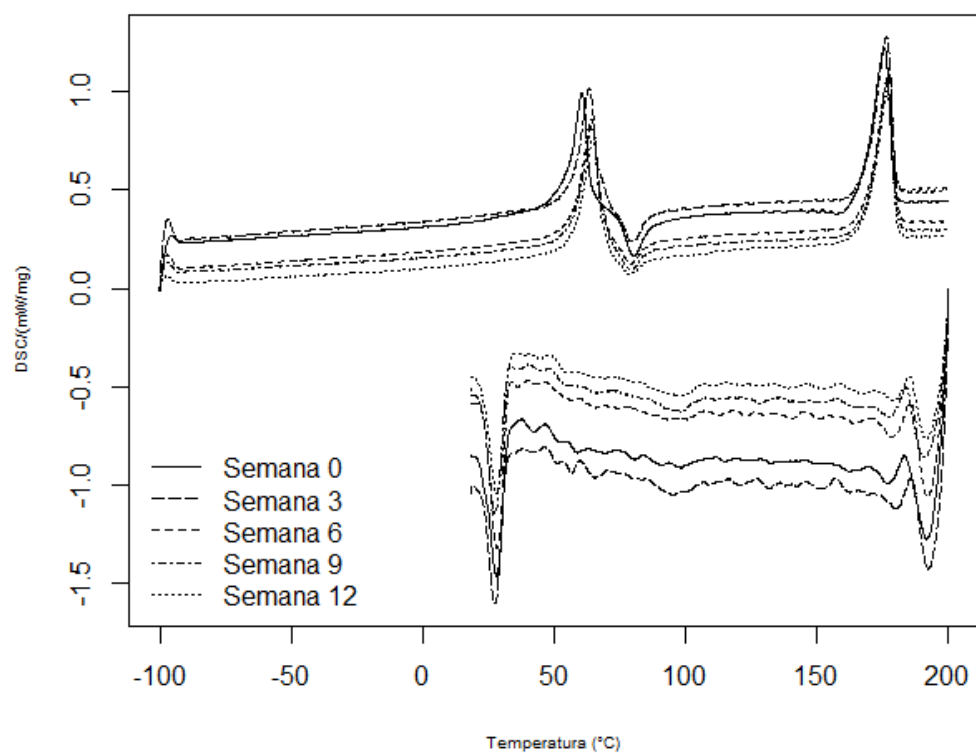


(b) PCL/PLA 75/75 mg/ml.

Figura C.1: Resultados del DSC para el agua destilada.

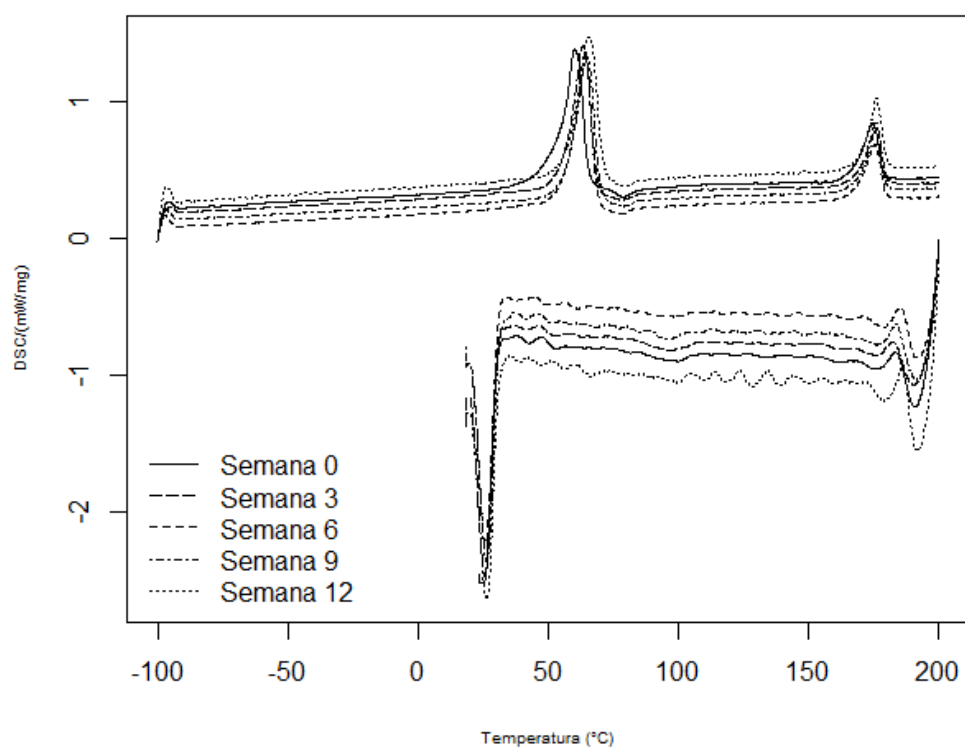


(a) PCL/PLA 100/50 mg/ml.

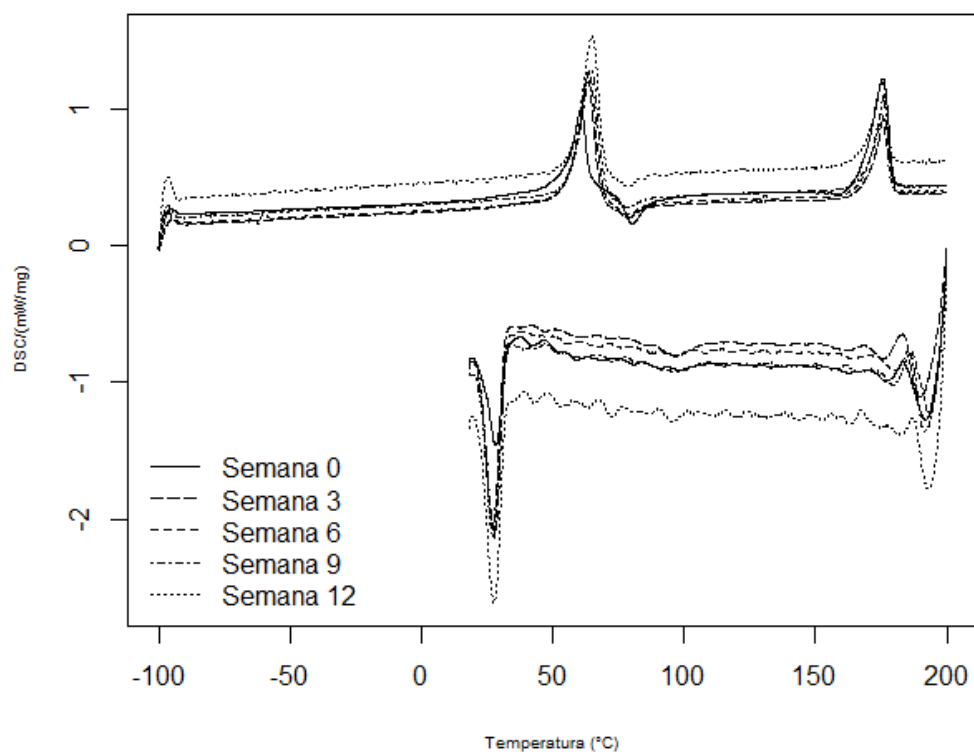


(b) PCL/PLA 75/75 mg/ml.

Figura C.2: Resultados del DSC para el DMEM.

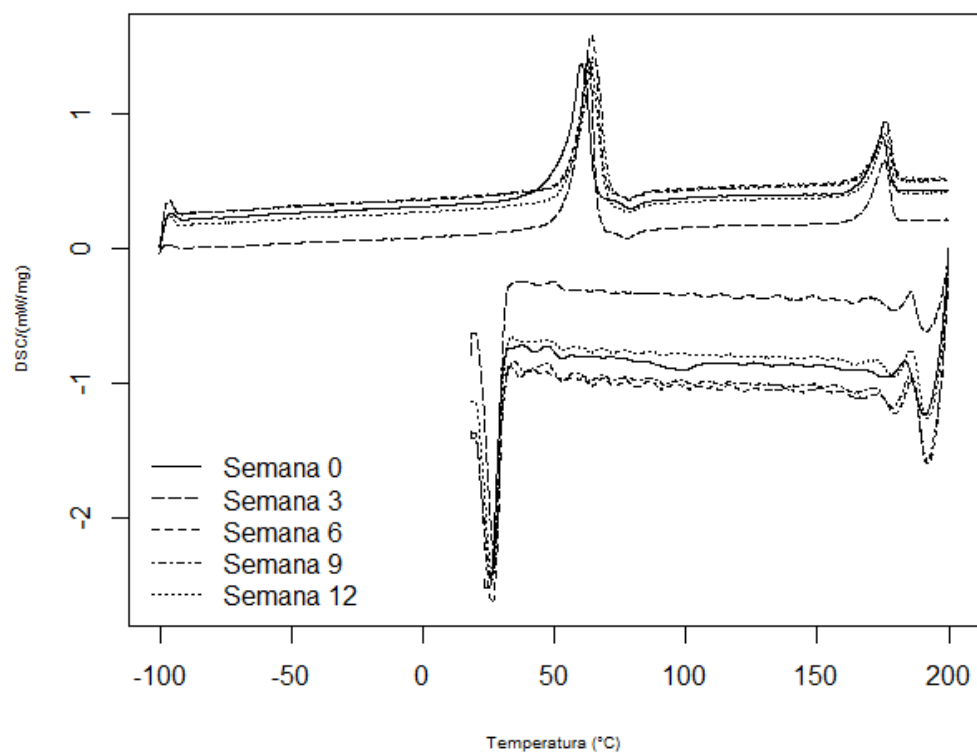


(a) PCL/PLA 100/50 mg/ml.

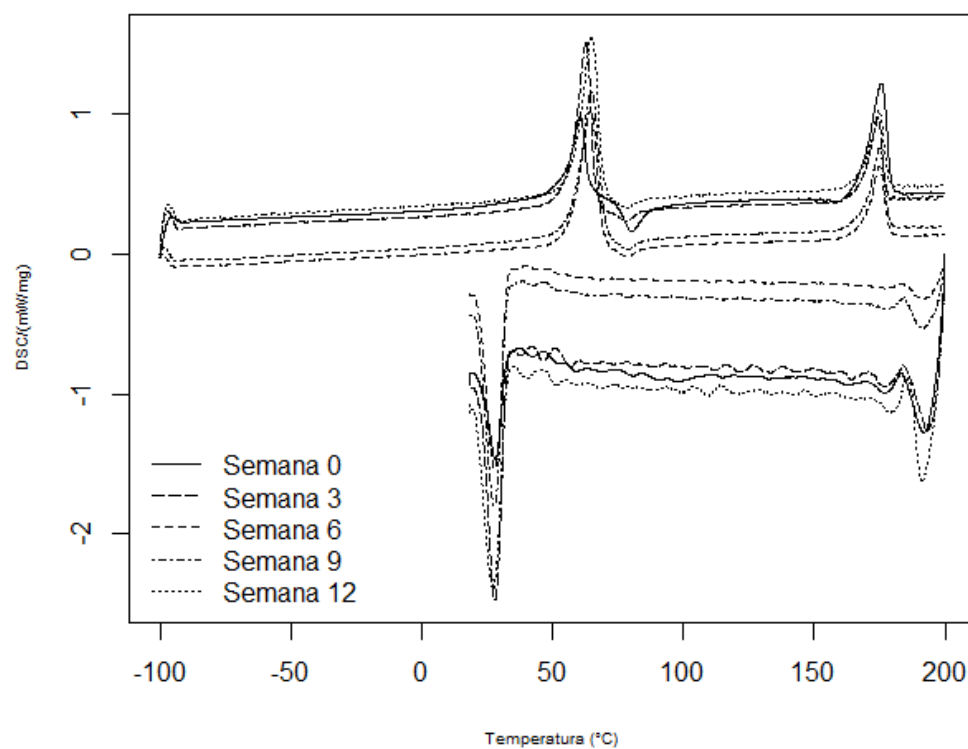


(b) PCL/PLA 75/75 mg/ml.

Figura C.3: Resultados del DSC para el m-SBF.



(a) PCL/PLA 100/50 mg/ml.



(b) PCL/PLA 75/75 mg/ml.

Figura C.4: Resultados del DSC para la Tripsina.

Evolución de las propiedades térmicas

Cuadro C.1: Evolución de las propiedades térmicas en agua destilada ⁸.

Polímero	T _{gPCL}		T _{mPCL}		T _{mPLA}		T _{cPCL}		T _{cPLA}		ΔH _{mPCL}		ΔH _{mPLA}	
	S0	S12	S0	S12	S0	S12	S0	S12	S0	S12	S0	S12	S0	S12
1	-62.27	-60.87	60.97	64.9	-	-	26.1	26.33	-	-	83.76	81.93	-	-
2	-59.4	-60.37	60.07	64.23	174.37	175.2	25.33	25.23	190.47	192.07	62.20	57.99	18.62	17.73
3	-59.77	-61.37	60.5	64.37	175.57	176.8	27.97	28.47	191.3	191.77	24.03	38.13	35.11	33.04
4	-59.33	-60.1	60.8	64.5	175.77	176.47	26.87	29.73	191.27	193	17.48	40.30	42	33.47

Cuadro C.2: Evolución de las propiedades térmicas en DMEM.

Polímero	T _{gPCL}		T _{mPCL}		T _{mPLA}		T _{cPCL}		T _{cPLA}		ΔH _{mPCL}		ΔH _{mPLA}	
	S0	S12	S0	S12	S0	S12	S0	S12	S0	S12	S0	S12	S0	S12
1	-62.27	-60.40	60.97	65.47	-	-	26.1	24.1	-	-	83.76	76.47	-	-
2	-59.4	-59.9	60.07	64.37	174.37	175.77	25.33	25.27	190.47	191.87	62.20	55.57	18.62	18.85
3	-59.77	-59.8	60.5	64.53	175.57	177.03	27.97	28.13	191.3	192	24.03	33.29	35.10	32.6
4	-59.33	-60.1	60.8	64.4	175.77	175.87	26.87	29.47	191.27	192.07	17.48	40.19	42	33.24

Cuadro C.3: Evolución de las propiedades térmicas en Tripsina.

Polímero	T _{gPCL}		T _{mPCL}		T _{mPLA}		T _{cPCL}		T _{cPLA}		ΔH _{mPCL}		ΔH _{mPLA}	
	S0	S12	S0	S12	S0	S12	S0	S12	S0	S12	S0	S12	S0	S12
1	-62.27	-60.03	60.97	64.93	-	-	26.1	27.63	-	-	83.76	81.26	-	-
2	-59.4	-60.57	60.07	64.83	174.37	176.3	25.33	25.1	190.47	191.73	62.19	62.81	18.62	17.84
3	-59.77	-60	60.5	64.9	175.57	174.63	27.97	27.13	191.3	191.1	24.03	61.70	35.10	22.46
4	-59.33	-61.5	60.8	64.2	175.77	176.43	26.87	30.13	191.27	192.27	17.48	24.44	42	41.57

Cuadro C.4: Evolución de las propiedades térmicas en m-SBF.

Polímero	T _{gPCL}		T _{mPCL}		T _{mPLA}		T _{cPCL}		T _{cPLA}		ΔH _{mPCL}		ΔH _{mPLA}	
	S0	S12	S0	S12	S0	S12	S0	S12	S0	S12	S0	S12	S0	S12
1	-62.27	-59.97	60.97	66.33	-	-	26.1	24.67	-	-	83.76	78.94	-	-
2	-59.4	-63.17	60.07	65.40	174.37	176	25.33	26.1	190.47	192	62.19	64.1	18.62	18.49
3	-59.77	-60.33	60.5	65.03	175.57	175.43	27.97	27.5	191.3	192.83	24.03	55.46	35.10	24.09
4	-59.33	-60.3	60.8	64.33	175.77	176.27	26.87	29.93	191.27	192.63	17.48	20.07	42	42.82

⁸Polímero 1: PCL 150 mg/ml. 2: PCL/PLA 100/50 mg/ml. 3: PCL/PLA 75/75 mg/ml. 4: PCL/PLA 50/100 mg/ml.

D. Resultados de los cambios en la masa

Cuadro D.1: Masa de las muestras antes de la incubación. Promedio en mg.

Polímero	Medio de degradación	Tiempo (semanas)			
		S3	S6	S9	S12
PCL 150	ddH ₂ O	14.20	14.10	15.77	11.87
	DMEM	12.90	12.50	13.53	12.93
	m-SBF	11.93	13.33	11.77	13.07
	Tripsina	16.40	16.20	15.07	16.03
PCL/PLA 100/50	ddH ₂ O	14.30	13.97	14.50	15.03
	DMEM	14.07	14.20	14	13.63
	m-SBF	14.63	14.73	15.03	14.50
	Tripsina	15.43	15.13	14.87	16.17
PCL/PLA 75/75	ddH ₂ O	16.67	16.73	6.97	17.03
	DMEM	16.97	17.17	16.87	13.97
	m-SBF	14.67	12.73	14.60	13.53
	Tripsina	11.83	11.87	11.90	12.13
PCL/PLA 50/100	ddH ₂ O	15.17	16.07	14.90	16.37
	DMEM	14.93	15.43	15.80	16.23
	m-SBF	14.80	15.13	15.87	15.10
	Tripsina	15.50	15.27	16.07	16.30

Cuadro D.2: Masa de las muestras luego de la incubación. Promedio en mg.

Polímero	Medio de degradación	Tiempo (semanas)			
		S3	S6	S9	S12
PCL 150	ddH ₂ O	13.90	13.93	15.20	11.77
	DMEM	13.37	12.47	13.40	13.27
	m-SBF	11.83	13.27	11.73	12.90
	Tripsina	16.13	16.07	14.70	15.70
PCL/PLA 100/50	ddH ₂ O	14.07	13.73	14.17	14.87
	DMEM	14.17	13.93	13.83	13.27
	m-SBF	14.57	14.50	14.60	14.40
	Tripsina	15.23	14.80	14.50	15.83
PCL/PLA 75/75	ddH ₂ O	15.93	16.03	16.27	16.17
	DMEM	16.30	16.17	15.87	12.97
	m-SBF	14.57	12.57	14.53	13.20
	Tripsina	11.73	11.33	11.27	11.30
PCL/PLA 50/100	ddH ₂ O	14.30	15.53	14.33	15.90
	DMEM	14.47	14.63	15.20	15.70
	m-SBF	13.80	14.13	14.93	14.17
	Tripsina	14.63	14.07	11.27	14.83

Cuadro D.3: Masa Remanente.

Polímero	Medio de degradación	Tiempo (semanas)			
		S3	S6	S9	S12
PCL 150	ddH ₂ O	98.02 %	98.84 %	96.41 %	99.24 %
	DMEM	103.69 %	99.72 %	99.02 %	102.55 %
	m-SBF	99.17 %	99.49 %	99.72 %	98.73 %
	Tripsina	98.35 %	99.17 %	97.60 %	97.87 %
PCL/PLA 100/50	ddH ₂ O	98.33 %	98.28 %	97.61 %	98.88 %
	DMEM	100.72 %	98.12 %	98.81 %	97.32 %
	m-SBF	99.55 %	98.42 %	97.12 %	99.32 %
	Tripsina	98.66 %	97.75 %	97.45 %	97.89 %
PCL/PLA 75/75	ddH ₂ O	95.66 %	95.82 %	95.88 %	94.91 %
	DMEM	96.07 %	94.18 %	94.07 %	92.77 %
	m-SBF	99.33 %	98.64 %	99.54 %	97.55 %
	Tripsina	99.19 %	95.52 %	94.71 %	93.14 %
PCL/PLA 50/100	ddH ₂ O	94.29 %	96.59 %	96.19 %	97.20 %
	DMEM	96.70 %	94.71 %	96.06 %	96.67 %
	m-SBF	93.24 %	93.38 %	94.13 %	93.75 %
	Tripsina	94.44 %	92.15 %	70.41 %	90.98 %