



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



**ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA**

Curso Académico:

Agradecimientos

A mis amigos y familiares, agradezco su comprensión y apoyo durante la duración de todo el proyecto.

También quiero mostrar gratitud hacia todo el departamento del CBIT, tanto a compañeros como investigadores, por la ayuda que me han ofrecido y darme la oportunidad para realizar el trabajo con ellos, destacando especialmente a Laura Teruel Biosca, quien más presente ha estado ante los numerosos problemas que supone iniciarse en los laboratorios.

Resumen

En el presente TFG, se pretende fabricar y caracterizar un scaffold reforzado, que exhiba propiedades adecuadas para ser un injerto de hueso: como base, se parte del polímero policaprolactona (PCL), mientras que el refuerzo consiste en nano-láminas de óxido de grafeno (GO). En concreto, se evaluará la influencia del GO en las propiedades a compresión del scaffold, así como en la capacidad de cristalizar hidroxiapatita (HAp) en todo su volumen, como objetivos centrales del trabajo.

Para el estudio, se fabricaron en primer lugar los scaffolds con diferentes concentraciones de GO (muestras control y con 0.1, 0.2 y 0.5% wt de GO), empleando dioxano como disolvente y mediante la técnica *freeze extraction*. En cuanto a las propiedades a caracterizar, éstas son: porosidad, morfología por imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM), propiedades mecánicas a compresión, presencia de enlaces PCL-GO y presencia y cantidad de componente mineral de HAp.

Con tal intención, la caracterización se realizó de la siguiente manera: la porosidad se obtuvo a través de 3 métodos diferentes; la morfología del scaffold se examinó mediante imágenes de SEM, entre 30 y 3500 aumentos; las propiedades mecánicas se obtuvieron a través de ensayos de compresión; la presencia de los enlaces PCL-GO mediante espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR); la abundancia y distribución de HAp mediante imágenes de FESEM, entre 1k y 10k aumentos, en muestras sumergidas en fluido corporal simulado concentrado (5xSBF); y la cantidad de componente mineral a través de TGA.

Finalmente, se consiguió demostrar un aumento del módulo elástico aparente con la presencia de GO; pero no la influencia del GO en el módulo elástico durante la fase de densificación. Además, se confirmó la presencia de enlaces entre PCL-GO, así como demostrar cualitativa y cuantitativamente la influencia del GO en el crecimiento de HAp.

Resum

En el següent TFG, es pretén fabricar i caracteritzar un andamiatge reforçat que manifeste les adequades propietats per a empelts d'ossos: com a base, s'utilitza el polímero policaprolactona (PCL), mentre que el reforç consisteix en nano-lamines d'òxide de grafeno (GO). En particular, s'evaluarà l'influència del GO en les propietats a compressió de l'andamiatge, així com la capacitat de cristallitzar la hidroxiapatita (HAp) en tot el seu volum, com objectius centrals del treball.

Per a l'estudi, es van fabricar en primer lloc els andamiatges amb diferents concentracions de GO (mostres control i amb 0.1, 0.2 i 0.5% de pes en GO), utilitzant dioxane com a dissolvent i mitjançant la tècnica freeze extraction. Les propietats a caracteritzar són: la porositat, morfologia per SEM, propietats mecàniques a compressió, presència d'enllaços PCL-GO y presència y quantitat de component mineral de HAp.

Amb la mencionada intenció, la caracterització es va realitzar de la següent manera: la porositat es va obtenir per mitjà de 3 mètodes diferents; la morfologia de l'andamiatge per mitjà d'imatges de SEM, entre 30 y 3500 augments; les propietats mecàniques es van obtenir mitjançant els assajos de compressió; la presència d'enllaços PCL-GO per FITR; l'abundància i distribució de HAp per imatges de FESEM, entre 1k i 10k augments, en mostres sumergides en 5xSBF; i la quantitat de component mineral per TGA.

Finalment, es va aconseguir demostrar l'augment del mòdul elàstic aparent amb la presència del GO; però no la influència del GO en el mòdul elàstic al llarg de la fase de densificació. A més a més, es va confirmar la presència d'enllaços entre PCL-GO, així com demostrar qualitativa y quantitativament l'influència del GO en el creixement de HAp.

Abstract

In the following final degree's work, the intention is to manufacture and characterize a reinforced scaffold that shows suitable properties for bone graft applications: it is composed by polycaprolactone (PCL), meanwhile the reinforcement is based on graphene oxide (GO) nano-sheets. In particular, we will assess the influence of the amount of GO in the compression mechanical properties of the scaffold, as well as its capability for induce the growth of hidroxyapatite (HAp) crystals, as the main objectives of this project.

For the study, scaffolds with different concentrations were manufactured (control sample and samples with 0.1, 0.2 and 0.5% wt of GO), by using dioxane as a solvent and the manufacturing technique known as freeze extraction. The characterization properties are: porosity, morphology in SEM, compression mechanical properties, PCL-GO bond presence and the amount of HAp crystal.

The characterization was taken by the following methods: the porosity was obtained by 3 different methods; SEM was used for the assessment of the morphology, in a range between 30 and 3500 augments; the compression essay gave us its mechanical properties; the presence of PCL-GO chemical bonds was studied from the FTIR; the presence and distribution of HAp was observed by means of FESEM with a range of augments between 1k and 10k, and finally, the quantitative amount of HAp was taken from TGA.

Finally, an increase of the apparent elastic modulus due to the presence of GO was demonstrated; but it couldn't be possible in the case of the elastic modulus during the densification phase. Moreover, the PCL-GO chemical bonds were confirmed, as well as the influence of GO in the HAp crystals' growth, qualitative and quantitatively.

Índice

Contenido

Agradecimientos.....	1
Resumen	2
Resum	3
Abstract.....	4
Índice.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. Ingeniería tisular. Nociones básicas.	9
1.2. Ámbito de aplicación.	10
1.3. El tejido óseo. Generalidades, fractura y remodelación ósea.	12
2. CRITERIOS PARA EVALUAR EL SCAFFOLD. OBJETIVOS	16
2.1. Criterios y especificaciones del scaffold ideal.....	16
2.2. Objetivos del trabajo	17
3. Materiales y métodos	18
3.1. Materiales del proyecto: PCL, dioxano, GO y HAp	18
3.1.1 Policaprolactona.....	18
3.1.2. Dioxano	19
3.1.3. Óxido de grafeno	20
3.1.4. Hidroxiapatita.....	22
3.2. Medidas de porosidad	24
3.2.1. Método 1: Por cálculo de volumen dimensional.....	24
3.2.2. Método 2: Por pesada de la muestras secas y húmedas	24
3.2.3. Método 3: Por el método de Arquímedes	24
3.3. Módulo elástico. Ensayo de compresión.....	25
3.4. Enlaces químicos. FT-IR (Fourier-Transform InfraRed Spectroscopy)	26
3.5. Morfología. SEM y FESEM.....	27
3.5.1. SEM (Scanning Electron Microscopy)	28
3.5.2. FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy)	29
3.6. Ratio Ca/P. Análisis elemental por RX en FESEM	31
3.7. Cantidad de componente mineral. TGA (<i>Thermogravimetry</i>)	31

3.8.	Análisis estadístico	32
4.	Preparación de las muestras	36
4.1.	Materiales empleados	38
4.2.	Preparación de las láminas de GO.....	38
4.3.	Preparación de las muestras de PCL y combinación con GO	40
4.4.	Freeze Extraction.....	42
4.5.	Preparación del x5 SBF	45
4.6.	Inmersión de las muestras en SBF x5	47
5.	Resultados y análisis.....	50
5.1.	Porosidad.....	50
5.2.	Topografía. Imágenes de SEM	53
5.2.1.	Imágenes de SEM. Cara superior.....	54
5.2.2.	Imágenes de SEM. Cara inferior	55
5.2.3.	Imágenes de SEM. Sección transversal.....	56
5.3.	Propiedades mecánicas. Módulo elástico aparente	60
5.4.	Propiedades mecánicas. Módulo elástico, tensión de rotura y longitud de <i>plateau</i>	62
5.5.	Topografía de las muestras con HAp. Imágenes de FESEM.....	68
5.6.	Análisis elemental. Ratio Ca/P	70
5.7.	TGA. Cantidad de componente mineral	75
5.8.	FTIR. Enlace entre PCL y GO.....	75
6.	Conclusiones.....	81
7.	Perspectivas de futuro	84
8.	Anexos.....	86
8.1.	Información técnica sobre los equipos	86
8.1.1.	Balanza analítica de precisión	86
8.1.2.	Estufa de precisión universal	87
8.1.3.	Bomba de vacío de aceite	89
8.1.4.	Desecador	90
8.1.5.	Sonicador de varilla	91
8.1.6.	Centrífuga 5804R.....	92
8.1.7.	Baño de Ultrasonidos	94
8.1.8.	SEM JEOL JSM 6300	95

8.1.9. FESEM	96
8.1.10 Equipo de ensayo mecánico (electromecánica).....	97
8.1.11. Equipo de ensayo a fatiga (hidráulica).....	98
8.1.12. FTIR	99
8.1.13. TGA	100
8.2. Scripts y funciones empleadas en el análisis de datos	101
8.2.1. Función <i>emodulus.m</i>	101
8.2.2. Script <i>AllEmodulus.m</i>	102
8.2.3. Función <i>F_mec_parameters_v6.m</i>	103
8.2.4. Script <i>AllMec_param.m</i>	106
8.2.5. Script <i>meause_in_image.m</i>	106
8.2.6. Función <i>picos_lambda.m</i>	107
8.2.7. Función <i>picos_lambdaHAp_version.m</i>	110
8.3. Presupuesto	113
9. Bibliografía.....	120

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ingeniería tisular. Nociones básicas.

Por enfermedad entendemos aquella situación de un organismo en la que se ve alterada su funcionalidad habitual. A su vez, dado que las diversas funciones del cuerpo humano derivan, en última instancia, de la forma en la que se organizan las biomoléculas, células y tejidos que lo componen, la comprensión de las enfermedades se realiza desde la anatomía patológica, es decir, percibiendo las alteraciones desde un enfoque morfológico.

No obstante, uno de los abordajes más clásico de la medicina ha sido la cirugía; comenzando con la idea de reparar las lesiones con ciertos materiales que tolerase el cuerpo, o bien, por extracción de las partes lesionadas. Naturalmente, y con la información que hoy en día nos brinda la biología molecular y la histología, entendemos que reparar y sustraer no son la metodología más eficiente para tratar una enfermedad, siendo que no se cubre la totalidad de la funcionalidad perdida.

Con ello, la medicina trató de evolucionar hacia la tendencia de sustituir la morfología lesionada por medio de materiales, tanto biológicos como sintéticos, buscando otorgar el máximo de funcionalidad posible al organismo. Aun así, hay razones conocidas por las que la sustitución resulta insuficiente o desaconsejable para el tratamiento de enfermedades [1]:

1. Los materiales artificiales (prótesis sintéticas) tratan de reproducir la funcionalidad anterior, pero de manera incompleta, además de tener una vida útil limitada al no poseer capacidad regenerativa alguna.
2. Los materiales biológicos precisan de un origen, y no siempre se cuenta con la disponibilidad suficiente de donantes, además de poder promover la transmisión de ciertas enfermedades.
3. Pueden existir problemas asociados al rechazo inmunológico del cuerpo, a la hora de incorporar un material exógeno (de procedencia externa al organismo), y aunque se conocen estrategias de inmunosupresión para evitar los rechazos, ello implica aumentar la vulnerabilidad de los pacientes frente al resto de amenazas.

Es por tanto que la filosofía actual de la medicina en el ámbito quirúrgico es apostar por la regeneración. Surge entonces la medicina regenerativa, y consigo, la ingeniería tisular. Su propósito es el de tratar una enfermedad, aprovechando la capacidad regenerativa del cuerpo y potenciándola, logrando

incluso superar la funcionalidad anterior a la lesión. La ingeniería tisular se nutre del conocimiento recopilado de la histología y biología molecular, y su práctica se fundamenta en tres elementos clave:

- El primero son las células. Dado que la ingeniería tisular pretende dotar de la funcionalidad necesaria al implante, parte de éste debe estar dotado de ciertas propiedades biológicas, esto es, un conjunto de células que posean el potencial de crecer, propagarse y diferenciarse hasta lograr su finalidad regenerativa y funcional. Una consideración a tener en cuenta es que las células sean autólogas, es decir, con origen del propio paciente para evitar rechazos; y, además, que sean células madre, para garantizar un buen potencial de reproducción y diferenciación.
- A continuación, se requiere de un medio físico en el que incorporar las células para integrarlas y organizarlas, haciendo de esta plataforma (llamada *scaffold*) una interfase entre las células y el ambiente biológico del organismo al que se verán expuestas. Los *scaffold* pueden consistir en matrices extracelulares descelularizadas, o polímeros sintéticos. A su vez, éstas pueden ser o no biodegradables, dependiendo del propósito. La elección de emplear polímeros es por la gran versatilidad que los mismos ofrecen, así como por poseer propiedades fisicoquímicas similares a los polímeros naturales que se pueden encontrar en las matrices extracelulares. Una característica común de los *scaffold* es la alta porosidad que poseen, con tal de asegurar una gran interfase entre el medio y la superficie donde residen las células expuestas.
- Por último, con tal de acelerar el crecimiento y orientar la diferenciación, las células del *scaffold* requieren de estímulos específicos provenientes del ambiente. Para ello, es posible someterlas a estímulos externos mediante dispositivos concretos, ya sean fuerzas mecánicas o campos electromagnéticos; estímulos impuestos por la propia estructura del *scaffold*, como podría ser su rigidez; o también, otra posibilidad contemplada es recurrir a biomoléculas, como son los factores de crecimiento, que actúen de señalizaciones para desencadenar determinados procesos bioquímicos contemplados en el propio organismo. No obstante, dichas opciones no son exclusivas entre sí, pudiendo confeccionar estrategias que combinen varias fuentes de estimulación.

Estos tres elementos, las células madre, los *scaffolds* y los estímulos (externos, intrínsecos a la estructura del *scaffold* o de naturaleza bioquímica), conforman la tríada de la ingeniería tisular.

1.2. Ámbito de aplicación.

Una vez introducidas las ideas más fundamentales sobre la ingeniería tisular y su papel en la medicina, es hora de acotar el ámbito de aplicación del *scaffold* propuesto en el proyecto. Los *scaffolds* llevados a cabo y su caracterización pretenden aportar información útil, a modo de investigación básica, de cara al desarrollo futuro de un injerto con el que suplir las carencias de masa ósea.

Para comprender la utilidad de dicho injerto artificial, y sin entrar en detalle, se mencionarán a continuación las situaciones en las que éste se precisa con mayor demanda [2]:

- Como resultado de traumatismos, pueden darse uniones fallidas de hueso en las que se requiere de una intervención quirúrgica para su resolución. Como insistiremos más adelante, la capacidad de regeneración ósea de forma natural es limitada, y puede venir seriamente condicionada por situaciones de inestabilidad (si existe una movilidad excesiva, o hay un alto grado de fragmentación), en las que el nuevo tejido es incapaz de mantener unidas las partes fracturadas del hueso hasta su restauración.
- En casos de osteonecrosis, en las que, por falta de irrigación, las células del tejido óseo mueren, empeorándose las propiedades mecánicas y dejando oquedades que promueven la formación de grietas, finalizando con el colapso de la estructura ósea y las articulaciones adyacentes.
- En artroplastias (reemplazo de uno o varios elementos estructurales en una articulación), ya sea por una falta inicial de masa ósea para practicar la artroplastia, o bien durante una revisión de la misma, en la que una osteólisis haya provocado la falta de hueso.
- En la práctica de fusión espinal (unión entre vertebras), para el tratamiento de escoliosis (desviación de la orientación de la columna sobre el plano coronal).
- Por falta de masa ósea tras la extirpación de ésta, al encontrarse en forma de tumor.
- En aplicaciones quirúrgicas del área maxilofacial, para reconstrucciones faciales por traumatismos severos o defectos congénitos del crecimiento óseo.

Comprendido el foco al que va dirigido nuestro *scaffold*, ahora se pretende establecer cuáles son los criterios y especificaciones a imponer al "*scaffold* ideal", como aquel que resolviera la problemática comentada.

Aun tratándose de una investigación básica, es necesario respetar los criterios no sólo técnicos para el desarrollo del *scaffold*, sino también criterios acordes con la bioética. En esta situación, sin entrar en detalles sobre el principio de justicia y la accesibilidad a cualquier producto sanitario derivado de este tipo de investigaciones, el principio bioético que prima en esta etapa es el de no maleficencia. En pocas palabras, los *scaffolds* desarrollados no deben suponer riesgo alguno de lesión previsible para los pacientes, ni a corto ni a largo plazo; surgiendo como primeras especificaciones la biocompatibilidad del injerto y la bioseguridad de sus productos de degradación, en dichos plazos respectivamente.

En el desarrollo de las especificaciones técnicas, dado que el injerto debe dotar de la funcionalidad perdida, es comprensible que el material trate de mimetizar lo máximo posible el comportamiento biológico y fisicoquímico del tejido óseo. Con ello, cabe hablar con anterioridad sobre dicho tejido y su remodelación, para comprender qué debe buscarse para nuestro material.

1.3. El tejido óseo. Generalidades, fractura y remodelación ósea.

El tejido óseo desempeña la función principal de dar soporte estructural al aparato locomotor, así como proteger órganos vitales de mayor importancia estratégica para el cuerpo (las costillas, el cráneo y la columna vertebral) y actuar como almacén bioquímico de iones calcio para el cuerpo. Su histología es propia del tejido conectivo, la cual presenta una morfología bien estructurada, y sin pretender entrar en detalles sobre clasificaciones y organización del mismo, el tejido óseo puede verse descompuesto en sus células, matriz extracelular (fibras y sustancia fundamental) y el componente inorgánico (mineral):

- Células: Existen 5 tipos de células propias del tejido óseo.
 - Células osteoprogenitoras
 - Osteoblastos
 - Osteocitos
 - Osteoclastos
 - Células de la superficie ósea

Las células osteoprogenitoras son aquellas de origen mesenquimal que, tras diferenciarse, dan lugar a los osteoblastos. En pocas palabras, actúan como reservorio de potencial reproductivo de células para suplir la necesidad de formar tejido óseo.

Los osteoblastos son las células responsables de secretar todas las moléculas involucradas en formar la matriz extracelular y captar el componente mineral, llamado a este conjunto osteoide. Su disposición es pseudoepitelial (formando una superficie de recubrimiento allá donde se busque liberar osteoide, y futuramente, crear hueso). Las células de la superficie ósea son estas mismas células en un estado inactivo.

Los osteocitos son antiguos osteoblastos, enterrados en su propia matriz extracelular, ya mineralizada. Pese a que poseen menor actividad que los osteoblastos y no representan una función secretora, su papel es fundamental en la percepción de esfuerzos mecánicos y el inicio de la transducción y señalización para dar lugar a la remodelación ósea.

Finalmente, los osteoclastos son células de origen macrófago (aparecen como una fusión de éstos) y su papel es el de destruir matriz extracelular (proceso llamado resorción) con el que mantener un equilibrio frente a los osteoblastos y permitir la remodelación ósea.

Pese a la brevedad con la que se ha expuesto el conjunto de células propias del tejido óseo, es necesario tenerlas en consideración para cualquier evaluación de viabilidad celular del scaffold, para cada uno de los tipos de células. Dos consideraciones adicionales son que: 1. La porosidad del material debe ser la adecuada en tamaño como para permitir alojarlas en sus cavidades, así como ofrecer una buena interconectividad para comunicarlos entre sí; y 2. La acción de resorción de los osteoclastos acidifica localmente el medio en el espacio donde esta célula se aloje y desplace, por lo que habrá que tener en consideración cómo la disminución de pH pueda afectar al biomaterial en términos de degradación.

- Matriz extracelular (osteóide):
 - Fibras: Las fibras predominantes en este tejido son fibras de colágeno tipo I, que aportan resistencia a tracción.
 - Sustancia fundamental:
 - Glucosaminglucanos (condroitin sulfato, hialuronano y keratan sulfato) que aportan, junto con el agua absorbida, las propiedades de viscoelasticidad y resistencia a la compresión.
 - Complejo proteico para la mineralización: Osteocalcina (captura iones calcio de la circulación), osteonectina (vincula las fibras de colágeno y el componente mineral) y osteopondina (media la adhesión entre las células y la matriz extracelular).

La osteocalcina y la osteopondina, exclusivas del tejido óseo, son las proteínas diana a las que se examina su nivel expresión génica mediante técnicas de PCR, para evaluar el grado de adhesión y diferenciación celular del cultivo de células madre sobre el *scaffold*; ambos son aspectos fundamentales para garantizar que el grupo de células asumirá correctamente la función prevista.

- Componente mineral:

Trifosfatos cálcicos (en forma de Hidroxiapatita) como componente mineral fundamental, así como carbonato cálcico e iones magnesio, sodio y flúor y de metales pesados, en menor proporción.

Más allá de su composición, también es de vital importancia comprender su dinámica, pues en oposición a lo que puede llegar a pensarse, el tejido óseo es uno de los que mayor actividad metabólica presenta, encontrándose en constante modificación. En las situaciones de fractura, existen dos formas por las que el tejido óseo se puede reparar: 1. en situación de alta estabilidad (mediada por intervención de placas y tornillos de compresión) y 2. en situación de inestabilidad, en las que el organismo da lugar a la formación del cayo óseo.

La situación que nos atañe en la mayoría de los casos es la de inestabilidad, al querer acoplar una masa adicional de *scaffold* que termine formando parte del tejido; en el que éste deberá actuar de molde o sustituto de cayo óseo de forma parcial, desde el que mediar la osificación.

El proceso de consolidación de fracturas bajo condiciones de inestabilidad se puede resumir de la siguiente forma [3]:

1. Ante un daño, se produce un hematoma y se desencadena todo el proceso de inflamación inespecífica (posee una duración de 1 a 7 días). Aparece una vasodilatación, y sumado a la proliferación de capilares en la región afectada, acuden las familias de células correspondientes a la defensa, limpieza y cicatrización de la herida (neutrófilos, macrófagos y fibroblastos), formándose un tejido de granulación. Finalmente, se acontece con la liberación de factores de crecimiento para señalar la necesidad de formar un tejido más especializado.

Las propiedades mecánicas de este tejido inespecífico, en comparación con las del tejido óseo, son extremadamente pobres, confiándose en que el aumento de la sección de fractura por el hematoma proporcione la rigidez suficiente para mantener una relativa estabilidad. Sin embargo, muchas veces, y especialmente en situaciones con una baja irrigación, éste es el punto más crítico de inestabilidad por el que puede fracasar la consolidación de la fractura.

2. Tras la liberación de factores de crecimiento en la etapa anterior y un aumento en la irrigación, el hematoma y las fibras de cicatrización se va reemplazando progresivamente por un molde de cartílago, formándose el cayo blando (esta etapa tiene una duración de unas 3 semanas). En esta situación, la rigidez es más elevada, pero todavía existen riesgos de fracaso de fractura por inestabilidad, además de tener una evolución muy dependiente del estado de irrigación sanguínea.
3. El cayo blando se va sustituyendo lentamente, el molde de cartílago comienza a alojar células propias del tejido óseo, se libera osteoide y pasa a mineralizarse (proceso conocido como osificación osteocondral), dando lugar así a la formación del cayo duro (con una duración estimada de 3 o 4 meses), con propiedades mecánicas cada vez más similares al tejido óseo.
4. Finalmente, dado el sobredimensionamiento que se produce en la formación del cayo óseo (a modo de ensanchamiento radial), el diámetro del hueso y su organización interna se van reformando con los años, a través del proceso de remodelación ósea.

Con todo ello, la idea del scaffold es ser implantado para:

- Garantizar una mayor estabilidad en las etapas previas de formación del cayo duro, lo que para ello deberá reunir las propiedades mecánicas de resistencia a compresión/tracción y rigidez propias en dichas etapas (no necesariamente las máximas, propias de un hueso sano).
- Que el scaffold represente el molde desde el que sus células cultivadas liberen el osteoide, y que su estructura permita la captación y la nucleación de cristales de hidroxapatita (componente mineral mayoritario).

De esta manera, al anticiparse con el cultivo de células activas en el material, el cual garantice a su vez una estabilidad e integridad mecánica suficientes, es posible facilitar y disminuir el tiempo de consolidación de fracturas.

Para terminar, el propósito del *scaffold* es ser biodegradable, de manera que, con el paso del tiempo, la fractura del hueso esté reparada en presencia exclusiva de tejido óseo propio de la persona, sin ningún sustitutivo. Sin embargo, su tasa de degradación no puede ser arbitraria.

Resultan obvios los problemas que derivan de una tasa de degradación excesiva, desapareciendo el *scaffold* de forma prematura a la reparación de la fractura. Mientras que, una tasa de degradación demasiado baja, al haber una presencia prolongada del *scaffold* como elemento mecánico resistente desde el que soportar las cargas, provoca que el tejido circundante no reciba el estímulo mecánico necesario para inducir a la creación de un tejido óseo más resistente que reemplace el injerto, aplazándose la consolidación (fenómeno conocido como *stress shielding*). Es por ello que, bajo la perspectiva de la remodelación ósea, es fundamental que la tasa de biodegradación del *scaffold* esté sincronizada con la tasa de regeneración del tejido, de forma que se realice una transmisión progresiva de las cargas mecánicas al tejido óseo e inducir su crecimiento habitual.

Como último comentario, dicha transmisión de fuerzas se logra de forma adecuada cuando existe una buena similitud entre la rigidez de los elementos que soportan las cargas, esto es, que la rigidez del *scaffold* debe acercarse lo mejor posible a la rigidez propia del hueso.

2. CRITERIOS PARA EVALUAR EL SCAFFOLD. OBJETIVOS

2.1. Criterios y especificaciones del scaffold ideal

A modo de resumen, y con justificación previa en la introducción, se enuncian a continuación los criterios a tener en cuenta para evaluar el scaffold propuesto:

2.1.1. Criterios ético-sanitarios:

- Biocompatibilidad
- Bioseguridad de los productos de degradación

2.1.2. Criterios técnicos:

2.1.2.1. Criterios celulares:

- Viabilidad celular, para cada tipo de célula
- Tamaño de poro
- Interconectividad de poros
- Adhesión
- Proliferación
- Diferenciación

2.1.2.2. Criterios tisulares:

- Resistencia a tracción y compresión
- Grado de similitud en rigidez al tejido óseo a reparar
- Capacidad nucleante de hidroxapatita
- Biodegradabilidad
- Grado de similitud entre la tasa de biodegradación y reparación

Cabe añadir al listado un grupo más de propiedades relacionadas con el funcionamiento del injerto en su conjunto, y que integran propiedades anteriormente comentadas. Éstas son: la osteoinducción, osteoconducción y osteointegración [4].

La osteoinducción es el proceso por el cual se reclutan las células inmaduras, para fomentar a continuación su diferenciación a células pre-osteoblásticas, iniciándose la osteogénesis. Por tanto, ya no

es tanto la capacidad individual de que las células puedan depositarse y diferenciarse a células osteoblásticas, si no la capacidad del scaffold en sí para promover este hecho, requiriéndose otras propiedades como una buena interconectividad de poros y tamaño adecuado, así como la incorporación de posibles factores de crecimiento u otros estímulos para promover la osteogénesis.

La osteoconducción hace referencia a la capacidad de que pueda formarse hueso desde la superficie del implante. Esta característica depende de forma vital de la osteoinducción, pues dicho crecimiento surge de la actividad de las células alojadas en el injerto; sin embargo, también interviene la biocompatibilidad que ofrezca la superficie, librando su interfaz de capsulas fibrosas u otros microorganismos, así como la capacidad del scaffold de admitir la nucleación del componente mineral.

Por último, la osteointegración es la capacidad de dar lugar a una unión directa y estable entre el *scaffold* y el hueso restante, entrando en consideración las propiedades de osteoinducción y osteoconducción, además de las propiedades mecánicas del material y su evolución con la degradación en garantizar la estabilidad de dicha unión.

2.2. Objetivos del trabajo

Los objetivos fundamentales del trabajo son:

- Fabricar un conjunto de muestras híbridas de PCL y GO, con los porcentajes concretos del del 0,1, 0,2 y 0,5 %, así como una muestra control sólo de PCL, mediante la técnica de *Freze Extration* y con el empleo de dioxano como disolvente.
- Caracterizar la morfología, porosidad y, especialmente, las propiedades mecánicas a compresión de las muestras.
- Llevar a cabo un ensayo de bioactividad basado en SBF, comprobar el crecimiento de HAp y cuantificarlo, para demostrar la capacidad nucleante del GO.
- Demostrar la existencia de enlaces químicos formados entre la PCL y el GO, mediante la técnica de FTIR, para poder afirmar que el GO funcione como refuerzo mecánico.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales del proyecto: PCL, dioxano, GO y HAp

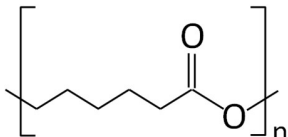
3.1.1 Policaprolactona

De entre los grandes grupos de materiales a emplear, cabría tener en consideración en un primer instante a los metales, dado que ofrecen propiedades mecánicas excelentes para suplir la elevada exigencia mecánica del tejido óseo. No obstante, si bien los metales tienen éxito trabajando como elementos de fijación y estabilización, su uso es desaconsejable para la regeneración ósea, ya que ni la mayoría son biodegradables (a excepción de aleaciones con Mg) ni su rigidez resulta adecuada (excesiva, provocando un *stress shielding* comentado en el apartado de remodelación ósea). Además, su biocompatibilidad es de las más inferiores en comparación con las cerámicas y polímeros, además de presentar riesgos asociados a su corrosión a largo plazo.

En lo que respecta a las cerámicas, además de ser más difíciles de procesar, su rigidez es todavía mayor y su resiliencia es demasiado baja como para soportar impactos que aguantaría el tejido óseo.

Por tanto, siendo los polímeros la rama de materiales que mayor versatilidad, procesabilidad y similitud en propiedades biológicas ofrece para el desarrollo de scaffolds (biodegradabilidad, ligereza, composición química...), veamos pues dónde reside el interés del empleo de la PCL.

La PCL es un poliéster de carácter semicristalino, que surge de la polimerización del monómero ϵ -caprolactona. Sus bajas temperaturas de fusión (60°C) y transición vítrea (-60°C) hacen de él un material fácilmente procesable, especialmente también por ser fácilmente soluble en disolventes de polaridad intermedia. Como puede apreciarse en su estructura química, posee una cadena alifática unida a un grupo éster que encadena con la cadena alifática de la siguiente unidad monomérica, de forma que este enlace permite su biodegradación por mecanismos hidrolíticos (si bien existen otros mecanismos de degradación enzimática y tras fagocitosis a bajo peso molecular, a tener en consideración).

PCL	
Fórmula:	Estructura:
$(C_6H_{10}O_2)_n$	

Temperatura transición vítrea	-60 °C
Temperatura fusión	~60 °C
Densidad	1,145 g/mL
Peso molecular	40-80 kDa

Tabla 1. Propiedades y estructura de la PCL

La principal diferencia con respecto al resto de polímeros similares, como podría ser PLLA (ácido poli-L-láctico), es que su tasa de degradación hidrolítica es muy más lenta, con un tiempo de degradación del orden de los 2-3 años. Por ello, la PCL permite aplicaciones biomédicas en las que su presencia como scaffold se requiera mantenida durante un tiempo considerable, como en el caso de liberación de determinados fármacos. Sin embargo, en el caso de la remodelación ósea, sería conveniente la reducción de dicha tasa de biodegradabilidad al orden de magnitud de pocos meses, con tal de evitar el *stress shielding*. Para conseguirlo, la comunidad científica ha optado por combinar la PCL con otros materiales, como por ejemplo crear heteropolímeros con PLLA obteniéndose disminuciones notables en el tiempo de biodegradabilidad del polímero [5].

No obstante, estos copolímeros por si mismos no cuentan con propiedades mecánicas comparables a lo exigible para un injerto de hueso. A razón de esta necesidad, se planteó utilizar el óxido de grafeno como refuerzo mecánico del polímero, con tal de aumentar a su vez su hidrofiliidad y dotarle de capacidad nucleante de hidroxiapatita.

Concluyendo, la PCL es sencilla de procesar, permite ser biodegradada en presencia de agua, con productos de degradación biorreabsorbibles (metabolizables por el organismo); y aunque por si sola, su degradación es lenta y sus propiedades mecánicas son insuficientes para la aplicación contemplada, se espera que su combinación con GO dé lugar a un material apto para el desarrollo de scaffolds destinados a cumplir como injertos artificiales de hueso.

3.1.2. Dioxano

Es un compuesto orgánico heterocíclico, del tipo éter, incoloro y con un olor leve, comúnmente empleado como disolvente de polaridad media. La razón de su uso es precisamente por ser capaz de disolver tanto la PCL como el etanol (empleado en forma de baño tras el *freeze extraction*, para eliminar el dioxano sin disolver la PCL). Sin embargo, así como el THF también funcionaría como disolvente de PCL y etanol, el dioxano muestra una temperatura de fusión más elevada (11.8 °C frente a -108.5 °C para el

THF), la cual permitió mantener el solvente en estado sólido durante el baño de etanol. Dicha situación se comprobó que era necesaria, pues si el disolvente se encontraba en estado líquido, la cantidad de polímero empleado (PCL) era insuficiente para mantener la integridad mecánica de la muestra durante el lavado de etanol, adquiriendo una consistencia mucosa.

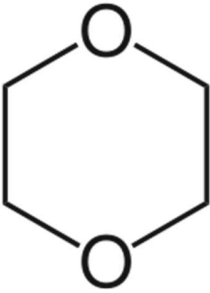

1,4-Dioxano	
Fórmula:	Estructura:
C ₄ H ₈ O ₂	
Temperatura de fusión	11,8 °C
Densidad	1.033 g/mL
Peso molecular	88.1 g/mol
Pictogramas GHS	

Tabla 2. Propiedades y estructura del dioxano

Cabe destacar la peligrosidad del dioxano como disolvente a la hora de trabajar con él. Posee la capacidad de oxidarse al exponerse al ambiente, formando peróxidos que, por un lado, pueden ser explosivos, y que, por otro lado, como sustancias con alto poder oxidante, se sospecha de sean carcinogénicos. A su vez, es sabido que irrita los ojos y las vías respiratorias, además de causar posibles daños en hígado, riñón y sistema nervioso central.

3.1.3. Óxido de grafeno

El grafeno es una forma alotrópica del carbono, la cual se manifiesta en forma de monocapa, donde los átomos de carbono se distribuyen en una red de anillos aromáticos (con disposición hexagonal).

Gracias a esta configuración bidimensional (a diferencia de la disposición de múltiples capas en el grafito), este material cuenta con propiedades mecánicas, químicas, eléctricas, térmicas, ópticas y biológicas que han despertado un gran interés en la comunidad científica, la cual ha explorado a su vez multitud de variantes de esta estructura (nanotubos, nanorods, fullerenos). Tal es así, que sus aplicaciones abarcan hoy en día los ámbitos de la electrónica (utilizándose como semiconductores en direcciones particulares de conducción, conforme su estructura), en energía (como super-acumuladores de energía eléctrica), la biomedicina (en nanofotodetectores, para diagnósticos), y particularmente, en la ingeniería tisular [6].

El gran inconveniente entorno a dicho material es la dificultad de replicar su fabricación (pues es requisito indispensable la condición de estructura en monocapa, sin que éstas se apilen, dando lugar a grafito), de forma que ésta sea escalable, eficiente y sostenible. Por ello, surgió como alternativa el óxido de grafeno (GO), de forma que su reducción daría lugar a la producción de grafeno a escala industrial.

En nuestro caso concreto, y el de muchos otros nichos para los investigadores, el GO genera interés en cuanto a sus aplicaciones. Su estructura es una versión oxidada del grafeno, en la que aparecen grupos químicos de naturaleza epoxi (A), grupos hidroxilo (B) y ácidos carboxílicos (C):

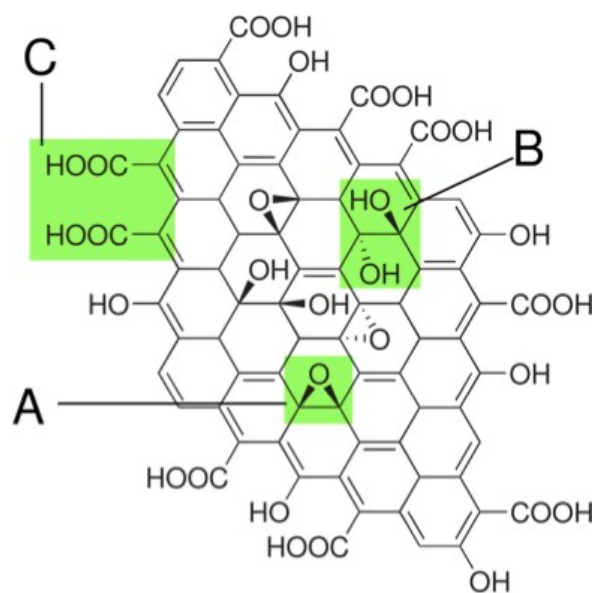


Ilustración 1. Estructura del GO y sus grupos funcionales [7].

Las ventajas que nos ofrece esta versión con dichos grupos químicos son dos, principalmente:

1. Estos grupos químicos aumentan la hidrofiliabilidad del material, por lo que es más sencilla su dispersión en sustancias con naturaleza polar, y por ende, en muchos polímeros.

- Dichos grupos actúan como regiones de unión a otros compuestos, ya sea el polímero al que vaya a unirse químicamente, bien a otras sustancias que sirvan para la funcionalización del material. Un efecto añadido de estos grupos, una vez el GO se ha incorporado al material, es que conceden mayor hidrofobicidad a los polímeros, lo cual se traduce en poder aumentar su grado de biodegradabilidad y promover el reconocimiento celular sin derivan a la formación de cápsula fibrosa (imprescindible para polímeros más bien hidrófobos, como la PCL).

En definitiva, el GO cobra protagonismo como material central de este estudio, pues es de esperar que, al utilizarse como refuerzo, aumente las propiedades mecánicas de la PCL, así como su hidrofiliidad, acelere su lenta biodegradabilidad, y le otorgue la capacidad de nucleación de los cristales de hidroxiapatita.

3.1.4. Hidroxiapatita

La hidroxiapatita (HAp) es el mineral por excelencia del tejido óseo, presente también en el esmalte y la dentina en formas más compactas, y constituye el componente mineral más duro del cuerpo humano. Su composición química está basada en fosfatos cálcicos, atendiendo a la fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ en su versión estequiométrica, manifestando una estructura compleja de geometría hexagonal respecto al OH⁻:

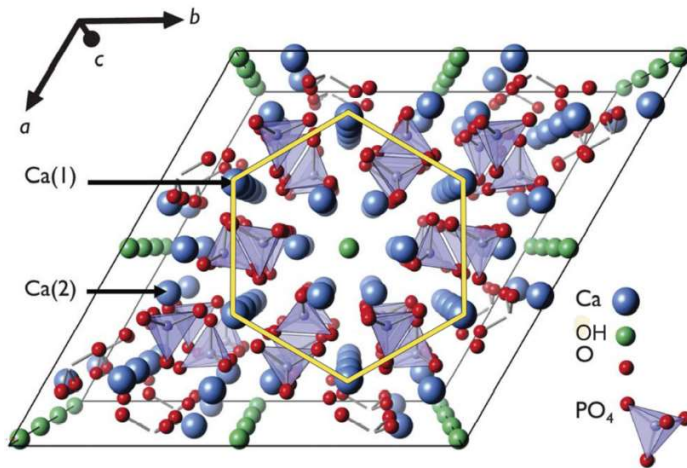


Ilustración 2. Estructura cristalina de la HAp [8].

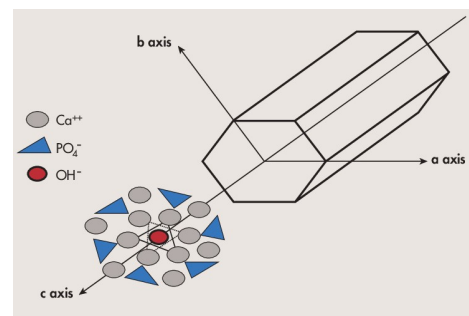
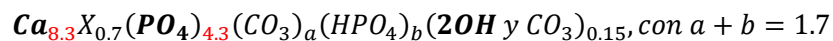


Ilustración 3. Estructura hexagonal de la estructura de HAp [9].

El interés principal de este mineral es que puede presentar bioactividad (y por ende biocompatibilidad) respecto a la formación del tejido óseo, es decir, promueve la cristalización directa de

HAp superficial para continuar el crecimiento mineral. Además, posee una buena estabilidad química, en detrimento de sus pobres propiedades mecánicas de fragilidad y tensión de rotura a tracción.

No obstante, en los fluidos corporales, la composición de la HAp es no estequiométrica. A consecuencia de interactuar con el medio biológico, los grupos ortofosfóricos se encuentran simultáneamente en diferentes estados de oxidación, además de aparecer un déficit de calcio como resultado de una no saturación del mismo en el medio (aparecen otras moléculas que demandan calcio al medio). Por ello, la fórmula empírica de la hidroxiapatita biológica es la siguiente [10]:



Nota: En la fórmula de la HAp biológica, además del déficit en Ca^{2+} y PO_4^{3-} , aparecen otros compuestos agregados, como el HPO_4^{2-} , el CO_3^{2-} que sustituye al grupo $H_2PO_4^-$; y otros elementos representados por X, como son Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , F^- y Cl^- .

Existe un gran interés en replicar la composición de la HAp biológica. En primer lugar, su estructura permite una cristalización directa del mineral óseo y su vinculación a fibras de colágeno por acción celular, sin mediación de capa fibrosa. En segundo lugar, permitir su reabsorción es de vital importancia para la remodelación de la estructura del tejido, acorde a las necesidades metabólicas y tensionales de los huesos (degradación que también deberá acompañar el scaffold). En este caso, la HAp biológica es deficitaria en Ca, y es sabido que, por ello, ésta permite ser reabsorbida de forma activa (por la acción de células como osteoclastos, macrófagos o leucocitos). De hecho, tanto mayor será la degradación que presente la HAp cuanto menor sea su ratio Ca/P (se corresponde con una cristalinidad menor, la cual hace la hace más accesible a su degradación).

En conclusión, vigilar el tipo de mineral que se genera sobre el scaffold es de gran importancia para deducir su biocompatibilidad y la capacidad de que la HAp que crezca sobre el scaffold permita ser reemplazada.

3.2. Medidas de porosidad

La porosidad de las muestras se obtuvo por tres métodos diferentes, a saber:

3.2.1. Método 1: Por cálculo de volumen dimensional

Utilizando un pie de rey, se tomaron 3 medidas de altura para cada muestra y se calculó la altura media (h_{med}) para cada una de ellas. Conociendo el diámetro (4 mm), se calculó el volumen de forma dimensional:

$$V_T = V_{dim} = \frac{\pi D^2}{4} \cdot h_{med}$$

Midiendo además la masa en seco ($m_{dry}=m_{PCL}$) de cada muestra, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\Phi_1 = 100 \cdot \left(1 - \frac{V_{PCL}}{V_{dim}}\right) = 100 \cdot \left(1 - \frac{m_{dry}}{\rho_{PCL} \cdot V_{dim}}\right)$$

3.2.2. Método 2: Por pesada de la muestras secas y húmedas

En lo que respecta al segundo método, se pesaron las masas tanto en seco como húmedas (m_{w_air}) de cada muestra, tras haberlas sumergido en etanol, drenando cuidadosamente el etanol superficial con un papel. Con dichos valores, el volumen de poros se corresponde con el volumen de etanol que almacenan las muestras, por lo que:

$$V_{poros} = V_{etOH} = \frac{m_{w_air} - m_{dry}}{\rho_{etOH}}; \Phi_2 = 100 \cdot \left(\frac{V_{poros}}{V_{poros} + \frac{m_{dry}}{\rho_{etOH}}}\right)$$

3.2.3. Método 3: Por el método de Arquímedes

Con el empleo de un kit de densidades acoplable a la balanza analítica de precisión, se pudo conseguir los valores del peso (entregado en términos de masa, m_{w_sum}) recogido por la balanza, atribuible a la fuerza resultante F entre el peso de la muestra (P) y el empuje que se manifiesta (E). Para el cálculo, se midieron las masas en seco, mojadas en aire y sumergidas, atendiendo al siguiente desarrollo:

$$F = g \cdot m_{w_sum} = P_{PCL} - E_{PCL} = g \cdot (m_{PCL} - \rho_{etOH} \cdot V_{PCL})$$

$$V_{PCL} = \frac{m_{dry} - m_{w_sum}}{\rho_{etOH}}; V_{poros} = V_{etOH} = \frac{m_{w_air} - m_{dry}}{\rho_{etOH}};$$

$$\phi_3 = 100 \cdot \frac{V_{poros}}{V_{poros} + V_{PCL}}$$

3.3. Módulo elástico. Ensayo de compresión

El propósito del ensayo de compresión es proporcionar los valores de propiedades mecánicas aparentes (acorde a su geometría y porosidad) del material. Siendo un ensayo destructivo, la manera de operar es colocando una muestra entre las prensas, programándose un movimiento de avance mediante un servomotor que somete a la muestra a compresión. Simultáneamente, se almacena y monitoriza la deformación que exhibe la muestra, a la par que se registra la fuerza experimentada mediante células de carga en la prensa fija.

En el caso de los *scaffolds*, al ser porosos, éstos manifiestan un comportamiento en tres fases diferenciadas en su curva tensión-deformación:

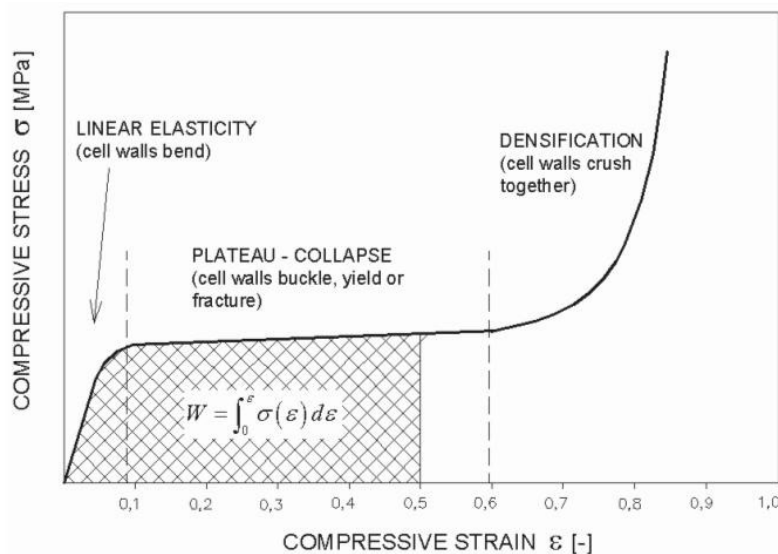


Ilustración 4. Representación de la curva característica a compresión de un material poroso [11].

- Una fase de crecimiento lineal, correspondiente a la deformación elástica de las trabéculas del material, extrayendo de dicha zona el módulo elástico aparente, correspondiente a la sección de las trabéculas que soportan el esfuerzo.

- La segunda fase (llamada *plateau*) posee una apariencia horizontal en la curva tensión-deformación, lo que indica una deformación progresiva en ausencia de una carga creciente, y se corresponde con el colapso de los poros. La longitud de extensión de la curva en esta fase es un indicativo de cuán porosa es la muestra.
- La tercera etapa (densificación, donde el material el actúa como un bloque macizo) comienza con el incremento de la tensión, experimentándose una deformación plástica del material (permite establecer el límite de deformación elástica). Finalmente, sucede la ruptura del material. Es en este punto donde se pueden obtener la tensión de rotura y máxima elongación.

En lo que respecta a ejecución, en ensayo de compresión se dividió en dos etapas. Se empleó una máquina de ensayos a tracción y compresión Microtest, accionada por un servomotor y con un límite de carga de -15 N de fuerza (condición de finalización del ensayo); empleada para obtener la curva de la primera etapa y con la que poder calcular el módulo elástico aparente con gran precisión. Para evaluar el resto del ensayo, se utilizó una máquina de ensayos a fatiga Microtest con capacidad hasta 2 kN y accionada de forma servohidráulica, limitando el ensayo al máximo de fuerza de -400 N, obteniendo de las curvas proporcionadas los valores de módulo elástico del material macizo, así como una estimación del límite del *plateau* y comienzo de la deformación plástica.

Los ensayos se realizaron con un control de movimiento a una velocidad de paso constante de 1mm/minuto y una frecuencia de adquisición suficiente para generar un volumen de datos en torno a los 300-500 datos por réplica.

3.4. Enlaces químicos. FT-IR (Fourier-Transform InfraRed Spectroscopy)

La técnica de FTIR nos permite hallar qué tipo de enlaces (intra e intermoleculares) se establecen entre los átomos, atendiendo al siguiente principio de funcionamiento:

Los átomos pueden modelizarse como esferas conectadas entre sí mediante una serie de muelles, equiparables a los diferentes tipos de enlaces que se establezcan. Dichas conexiones se ven sometidas a vibraciones por agitación propia de las partículas, y siendo que existen diferencias en las energías entre cada tipo de enlace, esto condiciona la vibración de las partículas, como si de muelles con rigideces diferentes se trataran. Por ende, si somos capaces de obtener información de la frecuencia/longitud de onda a la que vibra un determinado enlace, seremos capaces de deducir qué tipo de enlace es.

Para ello, la técnica del FTIR consiste en emitir radiación electromagnética (en el rango infrarrojo, donde se encuentran las vibraciones moleculares) a la muestra, de forma que aquellos enlaces que vibren en sincronía con el pulso de radiación electromagnética absorberán la energía asociada a ese pulso (fenómeno de resonancia), produciéndose un decaimiento en la señal captada del pulso tras atravesar la muestra. Con tal de obtener información de todos los tipos de enlaces posibles de una muestra, se evalúa todo el espectro y la señal captada se procesa mediante una transformada de Fourier, lo que nos

proporciona la respuesta en frecuencia (y por tanto equivalente a energías de enlace) de la muestra, de la que deducir su composición y estructura química.

Los enlaces diana, acorde a la estructura del GO sin enlazar, son:

- Enlaces O-H (presentes en grupos hidroxilo o carboxilo)
- Enlaces C-OH (presentes en grupos hidroxilo o carboxilo)
- Enlaces C=O (presentes en los grupos carboxilo del GO)
- Enlaces C=C (presentes en la propia estructura del GO)
- Enlaces C-O-C (tipo epoxi en GO)

No obstante, los enlaces entre el GO y la PCL (extremos de cadena) son:

- Enlaces R-CO-O-R' de tipo éter, con R perteneciente a la PCL y R' al GO
- Enlaces R-CO-O-CO-R' de tipo éster, con R perteneciente a la PCL y R' al GO

3.5. Morfología. SEM y FESEM

Cuando se desea ver estructuras con detalle inferior al límite de difracción de las lentes ópticas (en torno a un mínimo de 200 nm), se emplean tanto fuentes de radiación electromagnética más potente (UV o RX) como electrones acelerados en vacío con un comportamiento ondulatorio (en virtud de la dualidad onda-corpúsculo). La última alternativa es el caso de los microscopios electrónicos (SEM, FESEM), en los que, fundamentalmente, se emplean haces de electrones de barren o atraviesan una superficie para generar imágenes de las mismas con las partículas y radiación derivada recogidas.

Para comprender cómo se genera una imagen por microscopio electrónico, cabe mencionar qué clase de interacciones (las más importantes) suceden al incidir un haz de electrones sobre la muestra [12]:

- **Electrones Secundarios:** se producen por colisión inelástica contra la materia que incide (pierden energía). Dicha pérdida de energía da información de la presencia de la materia contra la que impacta el haz, lo que la hace responsable de la imagen.
- **“Backscattered e-“:** Son electrones reflejados por una colisión elástica. Al poseer la misma energía que al incidir, aportan la información de intensidad de la energía original, con la que obtener contraste respecto a la información puntual que aportan los electrones secundarios.
- **Electrones Transmitidos:** Son electrones que atraviesan la muestra, manteniendo la dirección del haz. En combinación con los electrones difractados (por colisiones tanto elásticas como inelásticas), es posible construir una imagen en base a los electrones que atraviesan la muestra (principio de funcionamiento del TEM).
- **Rayos X característicos:** Se producen por colisión de un electrón con otro electrón cercano al núcleo, y al dejar un hueco en dicho orbital, otro electrón en un orbital superior lo ocupa. Con este descenso a un orbital de menor energía, se emite una radiación EM en el rango de los rayos X, la

cual es característica del átomo que afecta, y por tanto proporciona información sobre su identidad. Esta información es de utilidad primordial para los análisis elementales que pueden realizar los microscopios electrónicos.

También aparecen otros resultados, como calor, corriente inducida sobre la muestra (la cual debe descargarse, recubriendo previamente la muestra de un material conductor), radiación de frenado por interacción electrostática con los orbitales de electrones, luz visible y electrones de Auger.

3.5.1. SEM (Scanning Electron Microscopy)

Recorriendo el SEM desde lo alto de su torre, encontramos:

1. El cañón de electrones, el cual proporciona una fuente monocromática (de una única frecuencia/energía)
2. Una válvula neumática para generar el vacío en el interior de la torre (la condición de vacío se genera para minimizar las interacciones del haz con materia que pueda modificarlo)
3. Dos agrupaciones de lentes condensadoras (campos de confinamiento magnético) y aperturas, las cuales dirigen y constriñen el haz de electrones, respectivamente
4. Bobinas de escaneo, que desvían el fino haz para barrer la superficie
5. Lente objetivo, para enfocar el haz en un punto concreto
6. La superficie donde se coloca la muestra, la cual debe de ir recubierta de un material conductor y estar conectada a tierra, para descargar toda la corriente inducida por la incisión del haz
7. Múltiples sensores para captar distintas radiaciones (e- secundarios, reflejados, transmitidos, RX), con las que generar la imagen o análisis de composición

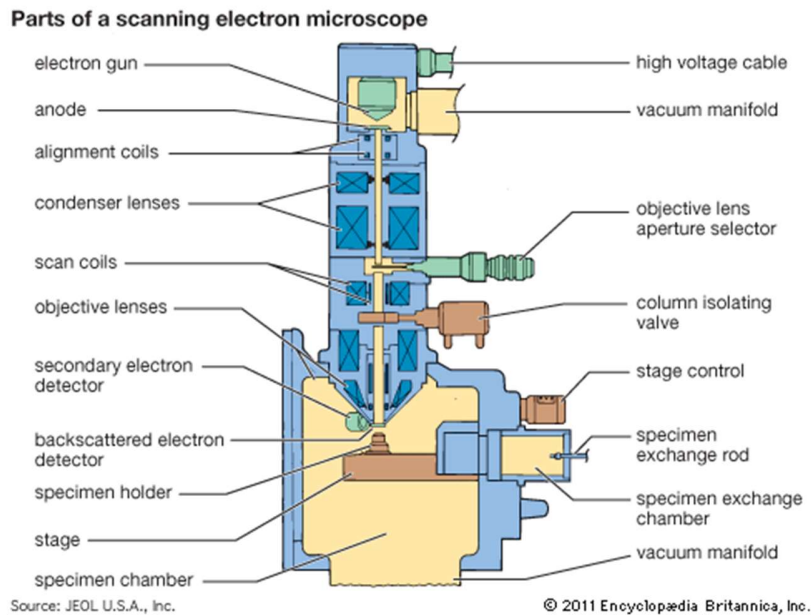


Ilustración 5. Representación de las distintas partes de un SEM [13].

El resultado de las imágenes, en comparativa con los microscopios ópticos, es que se obtiene una mayor resolución; pero, además, proporciona una gran profundidad de campo (espesor donde la imagen posee nitidez), dando imágenes con un efecto tridimensional, haciendo mucho más intuitiva la exploración de la topografía superficial.

En particular, el modelo de SEM utilizado para la toma de imágenes es SEM JEOL JSM 6300, trabajando a 5 kV.

3.5.2. FESEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy)

El fundamento del FESEM es idéntico a un SEM, con la salvedad de emplear un rango de energías mayor con el que obtener imágenes de mayor resolución. Ello radica en la forma en la que los electrones son generados: El generados por emisión de campo dispone de un cátodo con un cristal de tungsteno con una punta de un diámetro muy reducido (en torno a 1000 Å), encapsulado en un cilindro con un orificio por donde saldrá el haz; sobre la superficie exterior del cilindro yace en ánodo, al cual se le aplica una alta diferencia de potencial, lo que origina una alta concentración de electrones sobre la punta del cátodo de cristal de tungsteno, saliendo los electrones disparados por repulsión electrostática y guiados por la diferencia de potencial, creando el haz [13].

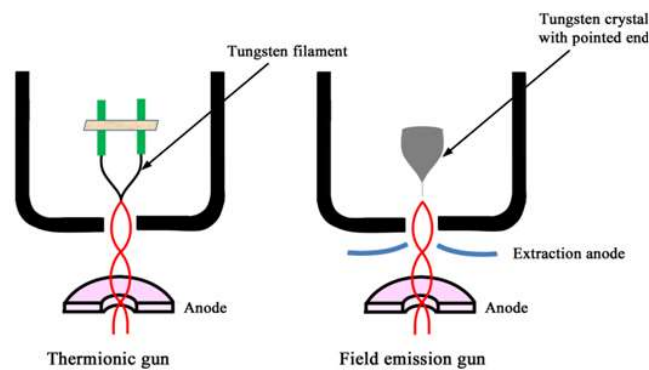


Ilustración 6. Comparación de un cañón termoiónico y un generador por emisión de campo [14].

Pese a haber hablado sobre las mayores energías con las que el equipo dota al haz de electrones, lo cual proporciona una mayor resolución espacial en las imágenes, su método de generación del haz consigue haces de electrones de alta y baja energía muy focalizados sin necesidad de potenciales excesivos (0.2-5 kV) respecto a los que cabría esperar en un SEM para conseguir la misma resolución espacial.

Como última característica distintiva, es de destacar la presencia de detectores en el interior de las lentes magnéticas, las cuales permiten un trabajo de alto rendimiento, al estar su funcionamiento optimizado para trabajar en alta resolución a bajos potenciales. En conjunto, los detectores de los que disponen los equipos de FESEM en las instalaciones del Servicio de Microscopía de la UPV son [15]:

- 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 (similitud al SEM). 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 secundarios *in lens*: a diferencia de SEM, éstos se encuentran en el interior de la columna de electrones, trabaja con electrones secundarios de baja energía y ofrece las imágenes de mayor resolución. Es muy sensible a las características superficiales de la muestra, por lo que es muy adecuado para la caracterización superficial de cualquier material.

- 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 electrones retrodispersados *in lens* EsB: es independiente del detector de secundarios *in lens*, lo que le permite ofrecer señal de retrodispersados pura, sin ninguna contaminación de electrones secundarios y a muy bajo potencial de aceleración. Proporciona más contraste en Z que ningún otro detector de retrodispersados, y es el único que puede seleccionar los electrones en función de su energía, lo que posibilita diferenciar elementos que se distinguen en solo unos pocos átomos.
- 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. La función que ofrece se conoce como Microanálisis por EDS, y proporciona información analítica cualitativa y cuantitativa de puntos, líneas o áreas seleccionadas en la superficie.

3.6. Ratio Ca/P. Análisis elemental por RX en FESEM

Conforme a lo comentado en SEM sobre los resultados de la colisión de haces de electrones con la materia, aparecen rayos X característicos de los átomos de los que la muestra se compone. En nuestro caso, el software de Microanálisis por EDS que dispone el equipo de FESEM fue el empleado para realizar el análisis elemental de las muestras.

3.7. Cantidad de componente mineral. TGA (*Thermogravimetry*)

El análisis termogravimétrico permite registrar las variaciones de masa de una muestra, en su evolución con la temperatura creciente y en atmósferas controladas en el interior del dispositivo (alto vacío, atmósferas inertes de Ar o N₂, ambientes oxidativos como aire seco; en condiciones de baja y alta presión atmosférica). Típicamente, los cambios de la masa conforme al aumento de la temperatura son decrecientes, respondiendo a los diferentes procesos fisicoquímicos a los que se ve sometida la muestra, tales como [16]:

Procesos físicos:

- Transiciones de fase
- Modificaciones en cristalinidad
- Absorción (penetración en volumen)
- Adsorción (adhesión molecular a superficie)

- Desorción

Procesos químicos:

- Adsorción química (separación de gases por precipitación de producto sólido mediado por un solvente)
- Descomposición térmica
- Reacciones reductoras/oxidativas

En nuestro caso, en lugar de evaluar la estabilidad química de nuestro scaffold, buscamos obtener la cantidad total de componente mineral tras la completa degradación térmica del componente orgánico del scaffold. Con ello, dicho valor final de masa se utilizará para cuantificar la cantidad de mineral de hidroxiapatita depositado en el scaffold, en función del tiempo de incubación

3.8. Análisis estadístico

La metodología estadística empleada para discriminar si existen o no diferencias atribuibles a los factores de estudio (concentración de GO, tiempo de incubación y tipos de métodos de medición) es el análisis de la varianza (ANOVA). Dicha técnica permite descomponer la variabilidad total de los datos en sus diferentes componentes, a saber, la variabilidad justificada por la posible influencia de cada uno de los factores de estudio, así como la variabilidad interna de los datos, asociada a la incertidumbre de las mediciones e homogeneidades durante la fabricación de las muestras.

El concepto de ANOVA aparece como una variante del estudio del análisis de la media, el cual, a su vez, es un estudio de regresión lineal. Toda medida puede reescribirse conceptualmente como una descomposición de tres factores:

$$y_{ij} = (\mu + \tau_i) + \epsilon_{ij} = y_i + \epsilon_{ij}$$

Donde μ y τ_i representan el valor constante y la influencia de la variable de estudio en la medida, respectivamente, las cuales se hallan mediante la regresión lineal; mientras ϵ_{ij} se trata del error particular del dato respecto de la regresión, y que refleja la variabilidad interna de los datos (para unas mismas condiciones en las variables de estudio).

A través de esta expresión, se puede restar las medias, obteniéndose:

$$y_{ij} - \bar{y} = y_i + \epsilon_{ij} - \bar{y}$$

Y operando debidamente, se puede llegar a la siguiente expresión, relacionada con la variabilidad de los datos:

$$\sum_i \sum_j (y_{ij} - \bar{y})^2 = n \cdot \sum_i (y_i - \bar{y})^2 + \sum_i \sum_j (y_{ij} - y_i)^2$$

Siendo n el número de datos evaluados para estudiar la influencia de cada factor i, se observa la relación entre la variabilidad total de los datos, la variabilidad de cada factor y la asociada a los datos internos en cada factor.

Desde dicha expresión, cada término de la ecuación se normaliza respecto a los grados de libertad que presenta, en particular:

$$GDL_{var.total} = \text{"Número datos totales"} - 1$$

$$GDL_{var.factor} = \text{"Número de valores de un mismo factor"} - 1, \text{ véase 4 concentraciones, etc.}$$

$$GDL_{var.interna} = GDL_{var.total} - GDL_{var.factor}$$

A dichos valores normalizados se les denomina Suma de Cuadrados Medios (CM):

$$CM_{var.factor} = \frac{n \cdot \sum_i (y_i - \bar{y})^2}{GDL_{var.factor}}; CM_{var.interna} = \frac{\sum_i \sum_j (y_{ij} - y_i)^2}{GDL_{var.interna}}$$

Conseguidos los valores CM, es sabido que, si el conjunto de datos es independiente de los factores de estudio, la variabilidad de los factores y la variabilidad interna resultan parecidas y siguen una distribución estadística F de Fisher. Entonces, para averiguar si existe dependencia o no de los datos frente a los factores de estudio, compararemos ambos CM, expresándolo como una ratio, y comprobaremos si sigue una distribución F de Fisher.

En términos prácticos, a modo de resumen:

- Calcularemos las sumas de cuadrados de los datos totales, para cada factor e internas a cada factor
- Hallamos sus grados de libertad asociados
- Normalizamos los valores de sumas de cuadrados con los grados de libertad, consiguiendo los CM
- Obtenemos el F-Ratio como cociente del $CM_{var.factor}$ y $CM_{var.interna}$
- Planteamos como hipótesis inicial (H0 nula) que el conjunto de datos es independiente, por lo que, para ello, cabrá esperar que el F-Ratio siga una distribución F de Fisher (para los gdl establecidos) para valores bajos/cercanos a la unidad.

- Evaluamos el F-Ratio en la curva de distribución acumulativa de F de Fisher, y establecemos como criterio que aceptaremos nuestra hipótesis nula si hay menos de un 5% de probabilidad de que el F-Ratio no pertenezca a dicha distribución.
- En función del resultado, se confirmará o rechazara la hipótesis, pudiendo asegurar con un margen de error aceptable la dependencia (o falta de ella) de los datos a los factores de estudio

Nota: La condición del 5% se corresponde a un valor típicamente establecido de error alfa de primera especie (falso positivo, rechazando la hipótesis nula aun cuando ésta es cierta). No obstante, puede afinarse más la condición con valores alfa del 1%.

4. Preparación de las muestras

Para poder evaluar las propiedades mencionadas en los objetivos sobre los scaffolds híbridos de PCL y GO, fue preciso fabricarlas acorde al siguiente esquema general:

- En primer lugar, se prepara la cantidad necesaria de GO, dispersándola correctamente sobre un solvente para permitir con posterioridad una distribución homogénea y efectiva de las láminas de grafeno en el *scaffold*. Con efectiva se refiere a que las láminas de GO no formen aglomerados similares al grafito, pues de hacerlo, empeoraría la transmisión de esfuerzos por deslizamiento de dichas láminas apiladas entre sí.
- A continuación, se preparan las cantidades necesarias de PCL en dioxano, para combinarse con el GO disuelto y mezclarlas en un baño de ultrasonidos.
- Una vez las muestras contienen las proporciones de PCL y GO debidamente disueltas junto con el solvente, se pasa a realizar la técnica de *Freeze Extraction*, mediante la cual se consigue una separación de fases sólidas a bajas temperaturas de la PCL con el GO por un lado, y el solvente por el otro.
- De esta forma, manteniendo una temperatura baja, al lavarse progresivamente el solvente de las muestras, el resultado es un material poroso que alberga la PCL con el GO combinado.
- Finalmente, se evaluará la bioactividad que presenta el *scaffold* mediante un ensayo con SBF (*Simulated Body Fluid*), así como otras propiedades, en distintos tiempos de inmersión de las muestras en SBF.

Para estudiar la influencia del GO sobre las diferentes propiedades de los scaffolds, se estableció fabricar cuatro tipos de muestras:

- Muestra con contenido exclusivo en PCL, que actúa de muestra control (muestra denominada "**C**")
- Muestra híbrida de PCL y GO (a un porcentaje del 0.1% en peso sobre PCL, muestra denominada "**1**")
- Muestra PCL/GO (0.2% de GO, muestra denominada "**2**")
- Muestra PCL/GO (0.5% de GO, muestra denominada "**3**")

La elección de los porcentajes en peso de GO se establecieron a criterio del co-tutor de este trabajo, si bien existen referencias que establecen el porcentaje de 0.03% de GO en peso como cercano al punto óptimo, en lo que respecta a las propiedades mecánicas.

Todas las muestras presentan una proporción de disolvente respecto al conjunto disolvente/PCL del 85%, a criterio del co-tutor.

Las cantidades necesarias fueron calculadas según el siguiente planteamiento:

Se decidió el espesor a obtener en las muestras (4.4 mm, a criterio de la tutora y limitado por la cantidad de GO conseguida), y conforme al diámetro del cristizador de teflón empleado, se calculó el volumen dimensional de la muestra a obtener. Con ello, se calcula la masa de PCL para conseguir dicho volumen, mediante la siguiente fórmula:

$$m_{PCL} = \eta \cdot \frac{\pi D^2}{4} \cdot h \cdot \left(\frac{1}{\rho_{PCL}} + \frac{\chi}{\rho_{diox}} \right)^{-1}$$

Donde h= 4.4 mm es el espesor de diseño, D= 80 mm es el diámetro del cristizador, ρ_{PCL} = 1.145 g/cm³ es la densidad de la PCL, ρ_{diox} = 1.033 g/cm³ es la densidad del dioxano, χ es el ratio en masas del disolvente frente a la PCL ($\chi = 85/15 = 5,6\hat{6}$), y $\eta = \phi_t/\phi_r$ es un rendimiento para sobredimensionar la masa necesaria de PCL, el cual tiene en cuenta la estimación de la porosidad real (ϕ_r , estimada a 0.7) frente a la porosidad teórica a conseguir ($\phi_t = 0.85$).

Los resultados teóricos de cantidades necesarias se exponen en la siguiente tabla:

DIMENSIONADO			CÁLCULOS	
Dimensionado de cada muestra			Volumen (mL/muestra)	22,117
Diámetro D (mm)	80	Fijo	m_PCL (g/muestra)	4,223
Altura h (mm)	4,4	Variable	V_diox_total (mL/muestra)	23,168
χ	5,666667	Fijo	m_total (g/muestra)	28,155
Porosidad			Propiedades	
Teórica	85	Fijo	ρ_{PCL} (g/cm ³)	1,145
Estimación	70	Variable	ρ_{diox} (g/cm ³)	1,033
η	1,214286			

Tabla 3. Parámetros de diseño y cálculos para la fabricación de scaffolds.

4.1. Materiales empleados

- PCL: Mn= 43-50 kDa (POLYSCIENCE)
- GO en estado de polvo (GRAPHENEA)
- Dioxano (SIGMA-ALDRICH)
- Agua milli-q (agua Tipo 1, ultrapura en términos de mínimas concentraciones de iones, sustancias orgánicas, residuos sólidos, coloides y bacterias)

4.2. Preparación de las láminas de GO

Se pesa la cantidad adecuada de GO en una balanza analítica de precisión (60.72 mg). Se incorpora agua milli-q a razón 1 mg GO/1 mL de agua milli-q (60 mL).

La disolución se introduce en un sonicador de varilla (150 W, a mitad de amplitud) durante 2 h (alternando entre el máximo de potencia y sin vibrar, a intervalos regulares de 0.5 s). El propósito de este paso es conseguir una dispersión homogénea de las partículas de GO, a un tamaño concreto de partícula (más reducida que el conjunto de tamaños en los que viene en estado de polvo).

Es necesario colocar una camisa de hielo para absorber la energía térmica procedente de la vibración del dispositivo, reponiendo el hielo cada 10 minutos. La razón de proteger al GO de un sobrecalentamiento puede encontrarse en pretender evitar que se formen agregados imprevistos entre las láminas por altos niveles térmicos.

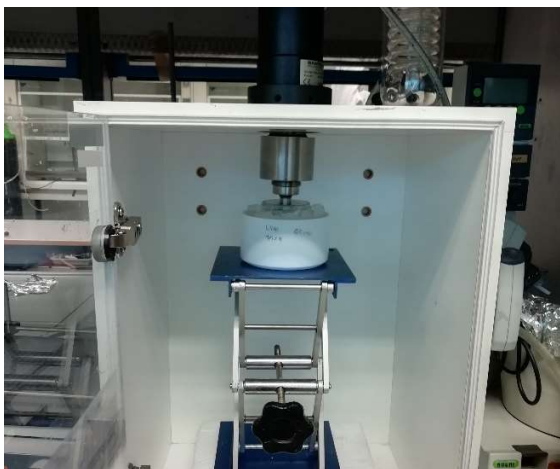


Ilustración 7. Sonicador de varilla.



Ilustración 8. Camisa de hielo para la disolución de GO.

Tras la dispersión, el volumen se distribuye en un número par de tubos Eppendorf de 2 mL de volumen, y éstos son llevados a la centrífuga 5804R, funcionando a 14k rpm durante 30 minutos. Los tubos deben estar dispuestos de forma simétrica respecto al eje de rotación para no provocar descompensaciones inerciales durante el funcionamiento de la centrífuga a altas revoluciones. La idea es conseguir separar el máximo contenido de agua de la fase sólida del GO, ahora con un tamaño de partícula más controlado y reducido.

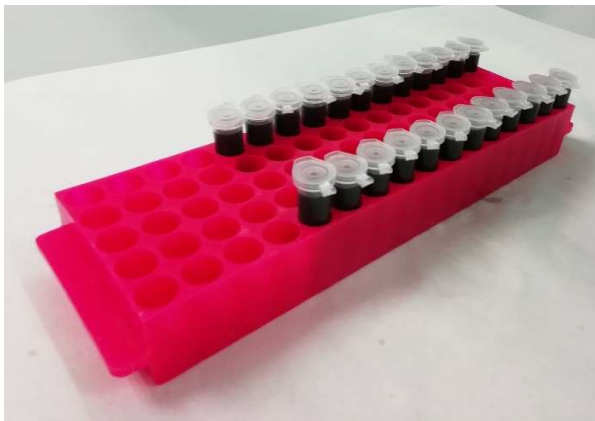


Ilustración 9. GO disperso, distribuido en tubos eppendorf.



Ilustración 10. Distribución de los eppendorf en la centrífuga.

A continuación, se extrae lo máximo posible de sobrenadante con ayuda de una micropipeta, sin extraer el GO disuelto en el fondo de los tubos. Éstos pasan a precintarse con *film*, y se le practican agujeros desde los que extraer progresivamente su contenido en agua. Los Eppendorf precintados se introducen en un desecador a vacío, a una presión de -55 mmHg y 40°C, durante 2 días.

Una vez evaporada el agua, se extrae la cantidad de GO sólido de todos los tubos (obteniéndose una cantidad total de 33.99 mg), los cuales son almacenados en una placa Petri de vidrio.



Ilustración 11. Eppendorf con film perforado, sobre el desecador.

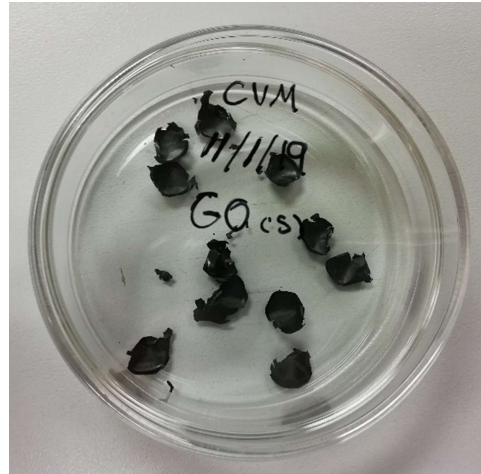


Ilustración 12. GO extraído de los eppendorf tras el secado.

Toda la cantidad de GO sólido se introduce en un frasco de vidrio con un volumen de dioxano, tal que la concentración de GO sea de 2 mg de GO/mL de disolvente, del cual se extraerá la cantidad necesaria para cada tipo de muestra. La mezcla es introducida en un baño de ultrasonidos (US) durante 30 minutos, para conseguir una buena dispersión de las partículas de GO en dioxano.

4.3. Preparación de las muestras de PCL y combinación con GO

Se pesaron las cantidades necesarias de PCL en forma de bolas para las cuatro muestras, guardándose en frascos de vidrio; así como la cantidad de dioxano necesario para cada frasco, descontando el dioxano que se le incorporará al agregar la solución de GO previamente preparada en el frasco general de US.

Los frascos con PCL y GO se almacenaron en una estufa a 37 °C durante 3 días, confirmando su correcta disolución.



Ilustración 13. Baño de US, para la dispersión de GO en dioxano.



Ilustración 14. Frascos con sus cantidades de PCL, dioxano y GO correspondientes a cada tipo de muestra.

Posteriormente, se añadieron los volúmenes correspondientes de GO disuelto en dioxano (a razón de 2mg/mL) a los frascos de cada muestra, con ayuda de una micropipeta, de forma que todos los frascos albergaran el volumen final de diseño de dioxano. Siendo $m_{PCL} = 4.223$ mg y $V_{diox_TOTAL} = 23.168$ mL los valores de referencia teóricos para todos los frascos, los cálculos y mediciones de los volúmenes añadidos son los siguientes:

Tipo de muestra	C	1 (0,1%wt GO)	2 (0,2%wt GO)	3 (0,5%wt GO)
m_PCL teórica (g)	4,223	4,223	4,223	4,223
m_PCL medida (g)	4,266	4,273	4,257	4,264
m_GO (mg)	0	4,223	8,447	21,117
Concentración de GO en dioxano = 2 mg GO/mL de dioxano				
V diox_TOTAL (mL)	23,168	23,168	23,168	23,168
V_diox+GO a añadir (mL)	0,000	2,112	4,223	10,558

V_diox+GO añadido (mL)	0,000	2,125	4,250	10,625
V_diox por frasco (mL)	23,168	21,056	18,944	12,609

Tabla 4. Cálculos y medidas de GO y volúmenes de dioxano por muestra.

4.4. Freeze Extraction

Para conseguir un material poroso, se recurrió a la técnica de *Freeze Extraction*. La técnica se realiza con el polímero (PCL) correctamente disuelto en el solvente (dioxano) y en frío, pues a bajas temperaturas es sabido que la solubilidad del polímero en el disolvente decrece, a razón de que las bajas temperaturas favorecen la interacción polímero-polímero. Mediante la congelación de la muestra, se consigue una separación de fases, una rica en polímero y otra rica en disolvente en estado sólido.

A continuación, la idea es retirar el solvente, sin generar daños en la estructura sólida (vítrea o parcialmente vítrea) del polímero, de forma que dicha eliminación producirá las oquedades que conforman la porosidad del material. En el caso de la técnica *Freeze Extraction*, la eliminación del solvente (etanol) se realiza por adición de otro solvente, capaz de disolver el disolvente original (dioxano) sin disolver la estructura del polímero (PCL). Esta eliminación progresiva del dioxano se realiza con etanol en frío (a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), para minimizar las interacciones que pueda haber con el polímero y no afectar a su movilidad (mantener la estructura porosa obtenida).

Finalmente, una vez se ha considerado que el solvente original se ha eliminado del scaffold en frío, se retira el etanol por secado de la muestra, resultando un scaffold cuya porosidad es dependiente de la proporción original de polímero y disolvente.

La puesta en práctica se llevó por congelación con nitrógeno líquido, empleando dioxano y PCL como disolvente y polímero, respectivamente, con una relación 85/15% en peso. En un contenedor apropiado, y con el uso de la equipación de protección individual (EPI) adecuada (máscara de gas, gafas protectoras y guantes criogénicos), se vertió la cantidad necesaria de nitrógeno líquido para la congelación de las 4 muestras.



Ilustración 15. EPIs para la utilización de N₂ (l).



Ilustración 16. Bombona y recipiente de contención para el N₂ (l).

Sobre un cristizador de teflón de 80 mm de diámetro, se vertió el contenido del frasco con la muestra a congelar, estando su contenido bien disuelto. Con los guantes criogénicos puestos, se vertió parte del nitrógeno líquido en un recipiente de corcho blanco. Con ayuda de unas pinzas antideslizantes, se fue sumergiendo lentamente el cristizador de teflón en posición horizontal en el baño con nitrógeno líquido, apreciándose una evaporación moderada del mismo, pero evitando que entraran salpicaduras de nitrógeno en la muestra, lo que ocasionaría una elevada fracturación. Tras 2 minutos de enfriamiento, se retiró el cristizador de teflón del baño de nitrógeno, y de él la muestra congelada. La fracturación de las muestras en forma de disco fue necesaria para introducir las en los botes con los baños de etanol (previamente enfriados a -20 °C durante un mínimo de 24 horas en congelador). Repitiendo este proceso para las muestras restantes, todas fueron almacenadas en sus baños de etanol en un congelador a -20 °C.



Ilustración 17. Muestra Tipo 3 congelada.

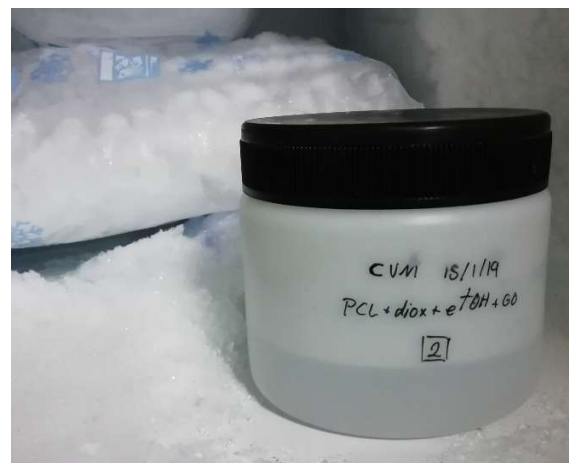


Ilustración 18. Recipiente con baño de etanol a -20 °C.

Todo este proceso se realizó en campana de extracción, por el riesgo que conlleva trabajar con dioxano.

El proceso de lavado de etanol siguió la siguiente secuencia de intercambios de etanol, con tal de renovar su contenido, eliminando el dioxano disuelto:

- Hasta el 1º cambio, se mantuvo la muestra en el congelador durante 24 horas
- Hasta el 2º cambio, se mantuvo la muestra en el congelador durante 24 horas
- El 3º cambio de etanol se realizó pasadas 3 horas
- El 4º cambio se realizó pasadas 24 horas, y el 5º pasadas 3 horas
- El último cambio de etanol se efectuó pasadas 24 horas

Una vez considerada la cantidad de dioxano eliminada, se dejaron secar las muestras durante otras 24 horas bajo campana de extracción, para eliminar el etanol (y trazas de dioxano) de forma más superficial. Para terminar de secar las muestras, fueron llevadas al desecador, donde se le sometió a la siguiente secuencia de presiones negativas, separadas en el tiempo para no ocasionar daños en las muestras al generar vacío por la bomba:

- El desecador se dejó a -20 mmHg durante la primera hora
- Se fue aumentando con saltos de -10 mmHg cada 20 minutos, hasta llegar a los -60 mmHg de presión
- Bajo la condición de -60 mmHg, se dejó en el desecador durante 12 horas

Las muestras se extrajeron del desecador, finalmente secas y listas para su caracterización.



Ilustración 19. Muestras en el desecador.

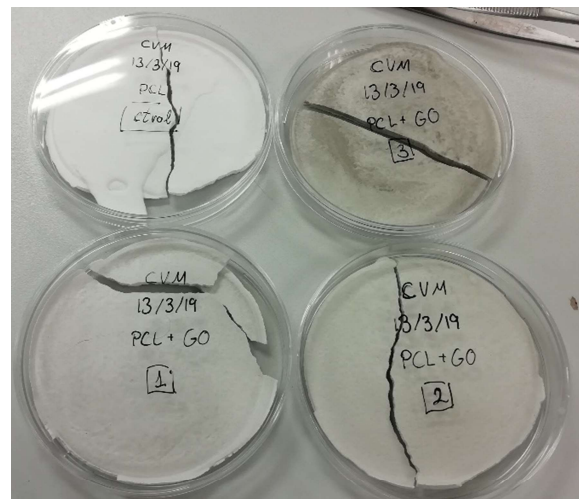


Ilustración 20. Muestras secas, en placas Petri de plástico rotuladas.

4.5. Preparación del x5 SBF

En múltiples estudios, los ensayos de bioactividad ósea se han llevado a cabo mediante la suspensión de los materiales en SBF. En éste, se pretende imitar con fidelidad (aunque con desviaciones convenientes) las concentraciones de los electrolitos presentes en los mismos fluidos corporales que en el entorno del tejido (plasma sanguíneo). Si bien hubo duda sobre la efectividad sistemática de este método frente a los ensayos convencionales in vivo, es sabido por estudios como el de Kokubo [17] que la formación de HAp por suspensión en SBF implicará la aparición de una capa de HAp in vivo, a la cual podrá unirse al tejido óseo en ausencia de agentes tóxicos o que deriven a reacciones inflamatorias específicas.

Éste resultado es de gran importancia, pues se traduce en una disminución considerable de experimentos con animales, además de la sencillez con la que puede elaborarse el estudio; fomentando una vía de evaluación de la bioactividad ósea más eficiente en la búsqueda de nuevos biomateriales.

La receta propuesta por Kokubo para su SBF convencional consiste en la adición ordenada de una serie de sales sobre un volumen de agua milli-Q, prestando especial atención al equilibrado del pH, pues se presenta un alto riesgo de precipitación de CaCO_3 (mineral que sustraería los iones Ca^{2+} de la posible HAp). Tal es así, que se reduce estratégicamente la cantidad de HCO_3^- para limitar la formación de carbonato cálcico, al estar el SBF sobresaturado de iones Ca^{2+} .

Ion	Ion concentrations (mM)	
	Blood Plasma	SBF
Na^+	142,0	142,0
K^+	5,0	5,0
Mg^{2+}	1,5	1,5
Ca^{2+}	2,5	2,5
Cl^-	103,0	147,8
HCO_3^-	27,0	4,2
HPO_4^{2-}	1,0	1,0
SO_4^{2-}	0,5	0,5

pH	7,2-7,4	7,4
----	---------	-----

Tabla 5. Comparativa de las concentraciones de iones en sangre y en el SBF.

Nota: El exceso de iones Cl⁻ procede de una receta anterior, cuyo valor pasó a ser corregido en la forma revisada de la receta de Kokubo (r-SBF).

Dados los problemas de precipitación que conlleva dicha receta, sumado al tiempo que consume el estricto control del pH, se optó por seguir otro método de preparación, propuesto en el artículo de Bohner [18]. En este caso, el procedimiento consiste en preparar dos soluciones de forma independiente (llamadas Sol. A y Sol. B), sin necesidad de respetar de forma tan estricta la adición de las sales ni de equilibrar el pH de la disolución, de forma que el SBF se obtendrá a través de la mezcla de ambas disoluciones.

En lo que respecta a los cálculos, se decidió preparar una cantidad total de 2 L de SBF, concentrado en un factor de 5 (a criterio de los tutores) para acelerar el proceso de crecimiento de HAp; si bien lo más representativo de la realidad sería respetar las concentraciones propias del plasma sanguíneo.

Algunos reactivos difieren del artículo original, pues en el laboratorio no había disponibilidad de dichas sales en estado anhidro (ausencia de moléculas de agua en su estructura), por lo que se tuvo que redimensionar los valores de las sales necesarias, siguiendo la siguiente fórmula:

$$m_{R-wet} = m_R \cdot \left(1 + \chi \frac{M_{water}}{M_R} \right)$$

Donde m_{R-wet} es la masa del reactivo con χ moléculas de agua en su estructura, m_R es la masa inicial del reactivo correspondiente a su estado anhidro, y M_{water} y M_R son las masas moleculares del agua y el reactivo, respectivamente.

Reactivos		Masa teórica (mg)		Masa medida (mg)	
Formula	MW (g/mol)	Sol. A	Sol. B	Sol. A	Sol. B
NaCl	58,44	31,065	31,065	31,08	31,07
KCl	74,55	2,25	-	2,32	-
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	228,22	2,31	-	2,32	-
MgCl ₂ ·6H ₂ O	203,31	3,11	-	3,14	-
CaCl ₂ ·6H ₂ O	218,99	-	5,76	-	5,81

Na ₂ SO ₄ ·10H ₂ O	322,04	1,632	-	1,63	-
NaHCO ₃	84,01	29,74	-	29,76	-
		Volumen teórico (mL)		Volumen medido (mL)	
		Sol. A	Sol. B	Sol. A	Sol. B
HCl	36,46	4,25	4,25	4,25	4,25

Tabla 6. Cantidades teóricas y medidas para la preparación de x5 SBF.

Nota: Para la preparación de la Sol. A, el bicarbonato de sodio debe añadirse en último lugar.

4.6. Inmersión de las muestras en SBF x5

Para poder sumergir las muestras, es necesario obtener numerosas réplicas de un tamaño reducido de los discos que se obtuvieron tras el *Freeze Extraction*. Para ello, se usó un troquel con un diámetro de 4 mm, aplicado sobre las muestras empapadas en etanol a -20 °C y colocadas sobre bloques para congelador, con tal de hacer el corte con la menor deformación tangencial y abombamiento posibles.

Con el SBF x5 preparado y las muestras seccionadas, se decidió incubar las muestras durante 1 día, y ver su morfología en FESEM para tener una idea del crecimiento de HAp. El resultado de ello fue un crecimiento excesivo, de manera que se decidió repetir el SBF x5 e incubar un conjunto de muestras (3 réplicas x 4 tipos de muestra) durante un tiempo de 12 horas, con el que capturar desde imágenes de FESEM un estadio de crecimiento de HAp más intermedio.

Los tiempos de estudio se actualizaron a los valores siguientes:

- Tiempo t1= 12 horas, con 3 réplicas (1 para FESEM + 1 FTIR/TGA + 1 extra) x 4 tipos de muestra= 12 réplicas
- Tiempo t2= 2 días, con 3 réplicas (1 para FESEM + 1 TGA + 1 extra) x 4 tipos de muestra= 12 réplicas
- Tiempo t3= 3 días, con 3 réplicas (1 para FESEM + 1 TGA + 1 extra) x 4 tipos de muestra= 12 réplicas
- Tiempo t4= 6 días, con 5 réplicas (1 para FESEM + 1 FTIR/TGA + 3 extra) x 4 tipos de muestra= 12 réplicas

Dándose un total de 48 muestras (más las 4 réplicas que se emplearon para las imágenes de FESEM, en un tiempo de inmersión de 1 día).

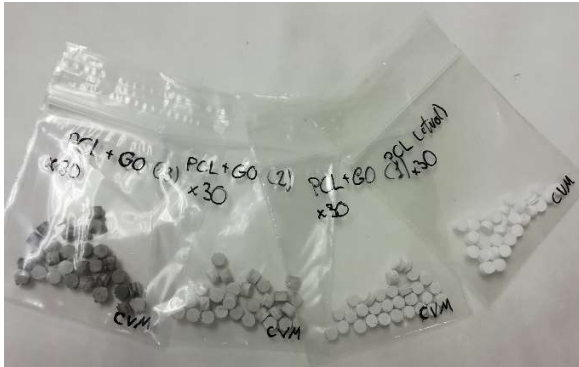


Ilustración 21. Muestras troqueladas, separadas en bolsas según el tipo de muestra.

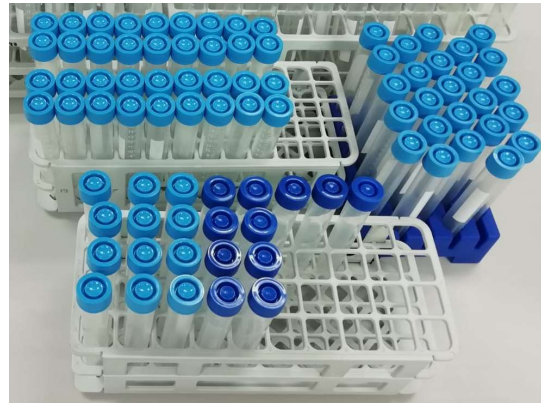


Ilustración 22. Tubos Falcon para la inmersión de muestras en x5 SBF.

Cada una de las réplicas para el ensayo se colocó de forma individual en tubos Falcon etiquetados, con un volumen concreto, relacionado con la superficie de la muestra, en un factor de $0.12 \text{ mm}^3/\text{mm}^2$. Dicha relación fue proporcionada por una compañera del laboratorio, quien estaba desarrollando un estudio relacionado con la incubación de muestras en SBF. A razón de dicho parámetro, y con los valores del diámetro y altura media de cada tipo de muestra (valores empleados para cálculos de porosidad con 3 réplicas), se calculó el volumen necesario de SBF x5 para los tubos Falcon:

	Altura media (mm)	Superficie (mm ²)	Vol. teórico SBF (mm ³)
Control	2,440	55,79	6,70
1	1,956	49,71	5,97
2	2,228	53,13	6,38
3	3,138	64,57	7,75
Diámetro (mm)	4	Relación V/S	0,12

Tabla 7. Cálculos de volumen teórico recomendable para la inmersión de las muestras en SBF x5.

Los tubos fueron guardados durante el tiempo que les correspondiesen (t1, t2, t3 o t4) en una estufa a 37 °C. A la hora de extraer las muestras, fueron lavadas con agua milli-Q y secadas de forma superficial con papel, sin ejercer compresión sobre las muestras, y llevadas a desecador en viales con film perforado para terminar de secarlas.

5. Resultados y análisis

En conexión con el apartado de técnicas de caracterización, se presentan a continuación las medidas y resultados de los diferentes métodos y ensayos, con sus respectivos análisis.

5.1. Porosidad

Siendo los métodos empleados para medir la porosidad el método dimensional, el cálculo del volumen de poros por etanol y el método de Arquímedes, respectivamente; se muestran a continuación los resultados de la porosidad en % para cada tipo de muestra y método.

	Método 1	Método 2	Método 3
Control	75,04	76,09	74,82
	72,43	71,29	69,70
	74,35	76,00	75,69
1	74,03	71,82	71,54
	72,43	72,04	70,97
	72,98	72,26	71,81
2	74,41	70,57	70,87
	74,67	71,86	71,85
	73,24	70,51	68,55
3	76,43	75,79	74,93
	76,36	75,13	73,41
	74,87	74,78	73,82

Tabla 8. Valores de porosidades medias, por tipo de muestra y método de cálculo.

Obteniendo además los valores de medias y desviaciones típicas para las 3 réplicas empleadas en cada ensayo:

	Media	Desv Tip		Media	Desv Tip
Método 1	74,27	1,34	Control	73,94	2,27
Método 2	73,18	2,19	1,00	72,21	0,89
Método 3	72,33	2,21	2,00	71,84	1,99
Media T.	73,26		3,00	75,06	1,03
			Media T.	73,26	

Tabla 9. Media y desviación típica de las muestras, según el método de cálculo y el tipo de muestra, respectivamente.

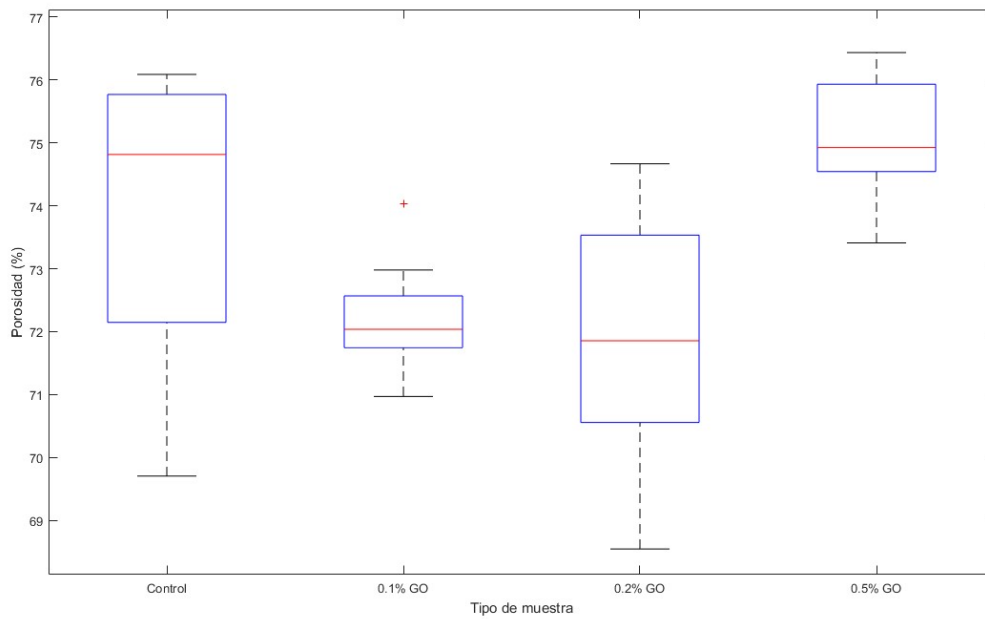


Ilustración 23. Diagrama box and whiskers de la porosidad en función del tipo de muestra.

Con ello, el análisis ANOVA se dividirá en dos partes. El primero se aplicará al tipo de ensayo como posible factor influyente en los valores de porosidad, y el segundo buscará determinar la influencia de la concentración de GO en la porosidad de las muestras.

ANOVA Métodos Porosidad	Suma de cuadrados	GDL	CM	F-ratio	F-Fisher	¿Sigue DIST. F?	
						$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,01$
Totalidad	149,2157224	35					
Factor 1 (entre grupos)	22,71047239	2	11,3552	2,96211	0,93441	Sí	Sí
Residual (interno a los grupos)	126,5052501	33	3,83349				

Tabla 10. ANOVA de los datos, siendo los métodos de porosidad el factor de estudio en la porosidad.

Resultando que el método con el que evaluar la porosidad de las muestras no tiene influencia significativa en los valores de porosidad de las muestras, si bien su F-Ratio en la distribución F de Fisher se halla cerca del límite de decisión.

ANOVA Concentración GO	Suma de cuadrados	GDL	CM	F-ratio	F-Fisher	¿Sigue DIST. F?	
						$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,01$
Totalidad	149,2157224	35					
Factor 1 (entre grupos)	61,39419647	3	20,4647	7,45684	0,99936	No	No
Residual (interno a los grupos)	87,82152597	32	2,74442				

Tabla 11. ANOVA de los datos, siendo el tipo de muestra el factor de estudio en la porosidad.

Por el contrario, el ANOVA aplicado al análisis de la concentración de GO como factor influyente rechaza la independencia de los datos, por lo que es posible afirmar (incluso con un error tipo I del 1%) que existe relación significativa entre la porosidad y la concentración de GO de las muestras.

Sin embargo, deteniéndonos en las diferencias en las medias de la porosidad para cada tipo de muestra, se observan dos efectos:

1. Una disminución de la porosidad con la cantidad de GO, hasta la muestra tipo 2
2. Un aumento, incluso mayor que en la media de muestras control, en la porosidad en las muestras tipo 3 (máxima cantidad de GO)

Pese a que la porosidad teórica debería de ser la misma para todas las muestras (85%), ésta disminuye atendiendo a muchas causas relativas al proceso de fabricación, así como el peso propio que origina cierto colapso de la estructura. Una de las razones más notables de la disminución de la porosidad real en las muestras es la cantidad real de dioxano efectivo (su volumen condiciona la porosidad final), pues no todo el dioxano participa en la disolución de la PCL y GO (se evapora, forma una capa en la superficie que limita su paso, no está totalmente disuelto...).

La justificación del primer efecto puede radicar en las diferencias de solubilidad de la PCL, dioxano y GO. El GO es hidrófilo, mientras que la PCL presenta un comportamiento más hidrófobo, razón por la cual se emplea el dioxano como disolvente de polaridad intermedia (similitud a la PCL). Por tanto, es posible que a mayor cantidad de GO enlazada a la estructura de la PCL, el scaffold exhiba un comportamiento más hidrófilo, de manera que la disolución en dioxano se vea dificultada (pues se requirió de un baño de ultrasonidos para fragmentar y disolver el GO en dioxano), surgiendo mayor cantidad de dioxano no efectivo en la disolución, lo que implicaría una menor porosidad final; tanto menor cuanto mayor cantidad de GO enlazada a la estructura de la PCL.

Para intentar explicar el segundo efecto, se puede partir de la hipótesis de que la cantidad de GO incorporada en las muestras de tipo 3 (0.5% de GO) excede de la solubilidad de GO en la estructura de la PCL (en las condiciones de fabricación establecidas), estando saturado el material y apareciendo acúmulos de GO sin presentar enlace con la PCL.

Con ello, las acumulaciones de GO se quedarían embebidas en el material, y por dificultad de disolución entre el dioxano y el GO, el dioxano se vería termodinámicamente forzado a establecer un mayor número de enlaces intermoleculares con la PCL (en resumen, el GO desplazaría el dioxano a disolver la PCL en mayor medida, por la cuestión de conseguir la configuración molecular de mayor entropía posible). Entonces, al haber mayor cantidad de dioxano disolviendo la PCL, el dioxano efectivo será mayor, y con ello, la porosidad se acercará más a la teórica (aumentará, más incluso que en las muestras control, pues no hay “fuerza” alguna que promueva la mayor disolución de dioxano y PCL en ausencia de GO).

5.2. Topografía. Imágenes de SEM

Los resultados de las imágenes de SEM se dividirán en tres categorías, a saber; imágenes de la cara superior, de la cara inferior y de la sección transversal de los scaffolds.

5.2.1. Imágenes de SEM. Cara superior

Las muestras manifiestan dos regiones, una más compacta y otra más disgregada que aporta la mayoría de la porosidad a la estructura. Sobre las regiones compactas, está presente un efecto piel (zonas de gran compactación, por donde apenas emergió disolvente) de forma que en algunas imágenes se

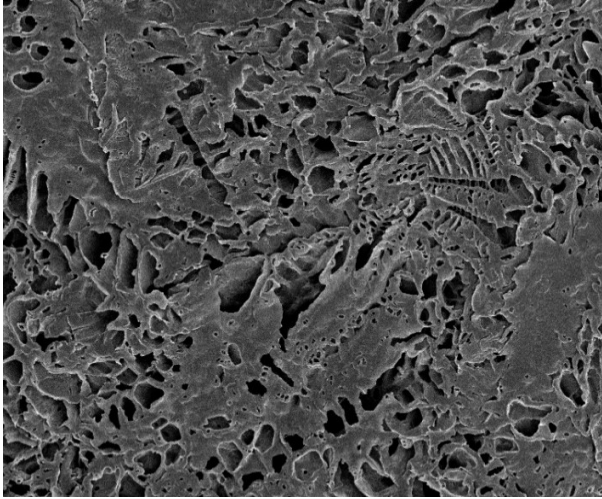


Ilustración 24. Visión general de la región porosa y la región compacta (efecto piel). Muestra Tipo 1, x200.

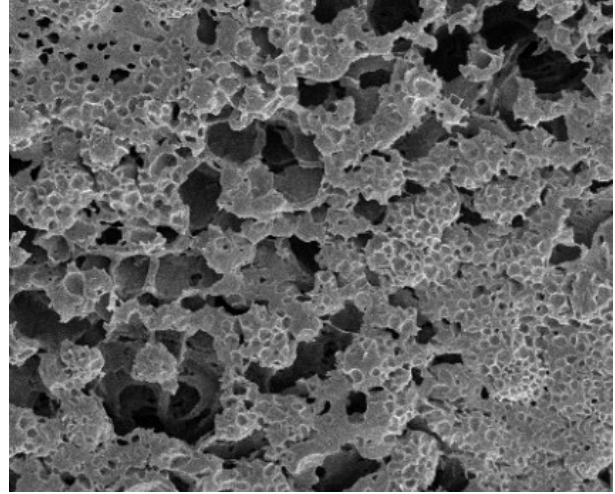


Ilustración 25. Visión general de la región porosa y la región compacta (poro superficial, sin interconexión). Muestra Tipo 2, x200.

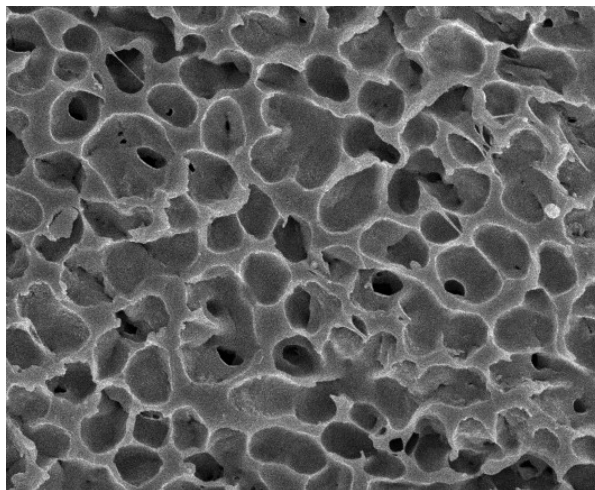


Ilustración 26. Detalle de los poros con efecto piel. Muestra Tipo C, x1000.

muestra una superficie plana, mientras que en otras imágenes, aparecen una serie de poros con efecto piel en la parte más superficial, al no estar interconectados con el resto de la estructura (por lo que el disolvente superficial es el responsable de ese tipo de poros).

5.2.2. Imágenes de SEM. Cara inferior

Algo similar sucede con la cara inferior de las muestras, mostrándose zonas de poros interconectados y regiones compactas con un marcado efecto piel, en esta ocasión sin poros con piel superficiales. La diferencia general es que la proporción de la región compacta aparenta ser mayor que en la cara superior, lo que va en consonancia con la mayor dificultad por parte del disolvente para escapar desde la base del scaffold, y verse esas últimas capas sometidas a la práctica totalidad del peso propio de la estructura (fomenta su compactación).

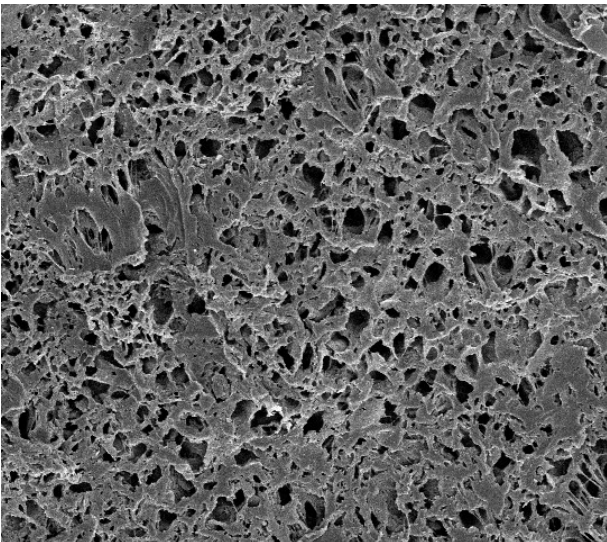


Ilustración 27. Visión general de la región porosa y la región compacta. Muestra Tipo 2, x200.

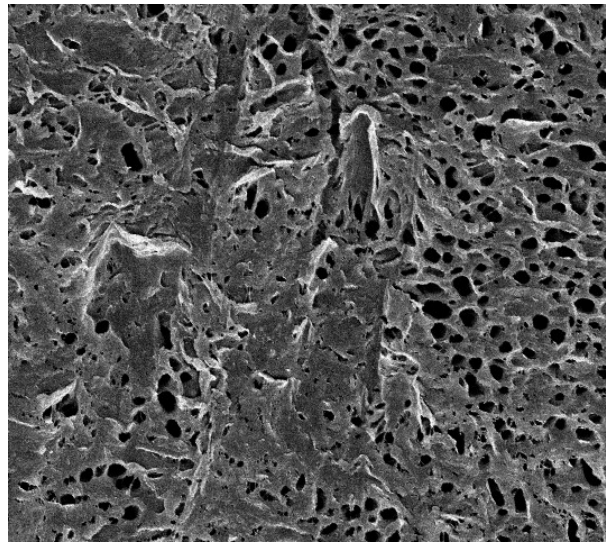


Ilustración 28. Visión general de la región porosa y la región compacta. Muestra Tipo C, x500.

Curiosamente, en la cara inferior de la muestra Tipo 3, se halló una región de baja porosidad y efecto piel, pero donde el material se apiló en múltiples capas con una apariencia fragmentada (similar a escamas irregulares).

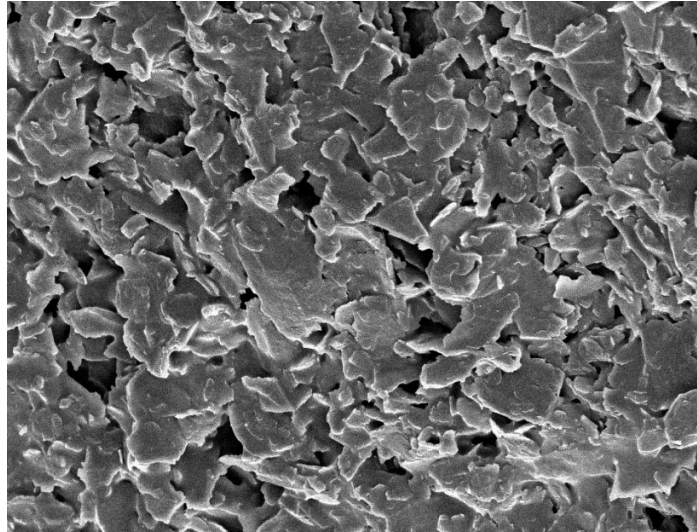


Ilustración 29. Detalle de las capas escamosas apiladas en la cara inferior. Muestra Tipo 3, x1000.

5.2.3. Imágenes de SEM. Sección transversal

En vista general, la sección transversal presenta una porosidad altamente conexa, en la que se aprecian hileras de poros que dibujan conductos ascendentes. Dichos conductos se conectan con otras hileras de poros con una inclinación considerable; parten de la base y sufren una desviación para confluir en conductos centrales aproximadamente perpendiculares a la base (formándose clusters de hileras).

A partir de algo más de la mitad de la muestra, los conductos se mantienen, pero pierden buena parte de la porosidad de sus paredes, terminando de comunicarse con la cara superior. También aparecen poros macroscópicos en la muestra.

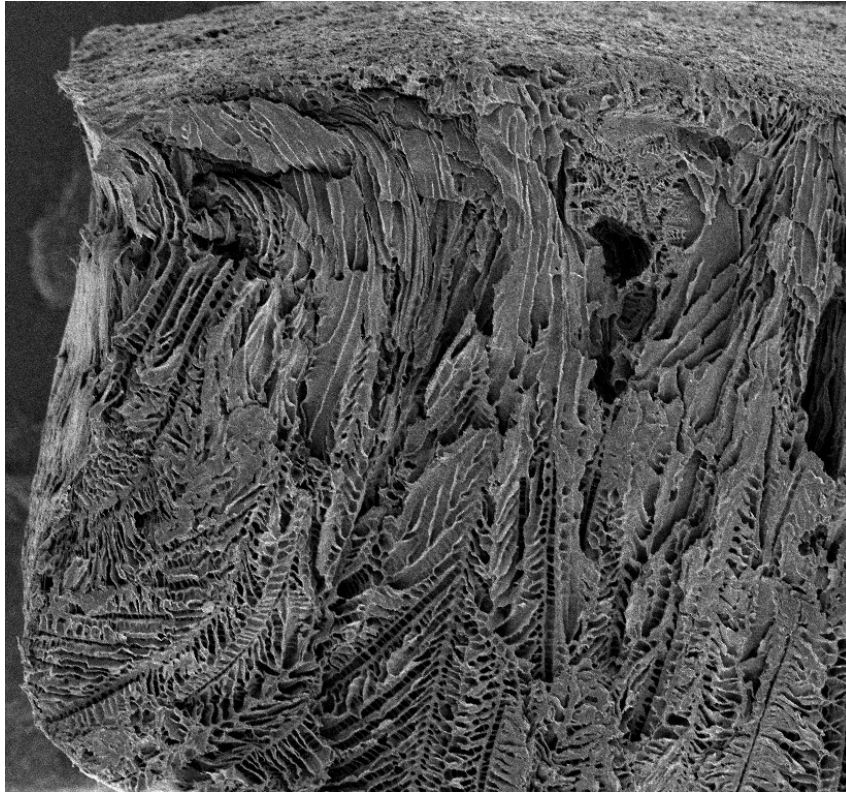


Ilustración 30. Vista de la sección transversal comentada. Muestra Tipo 1, x60.

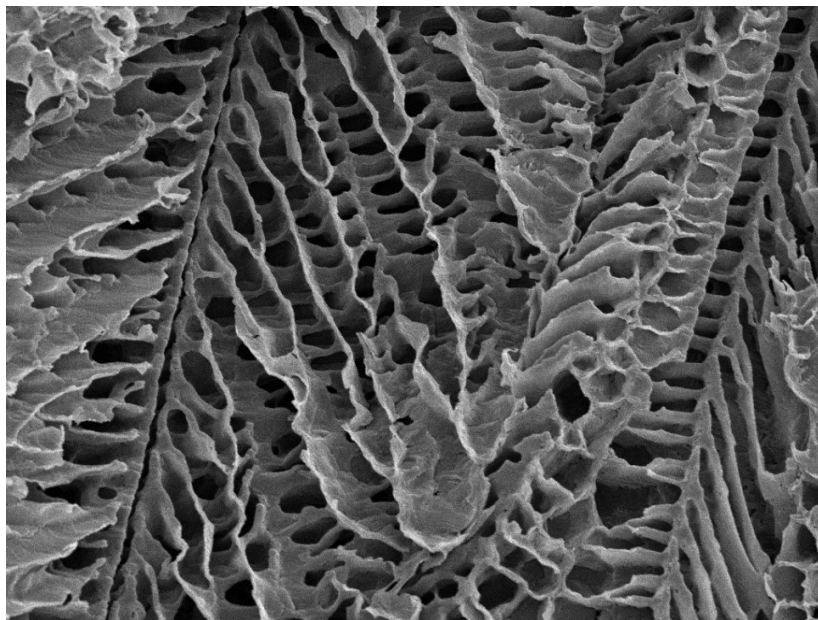


Ilustración 31. Detalle de las hileras inclinadas de poros interconectados, unidos a los conductos centrales. Muestra Tipo 2, x500.

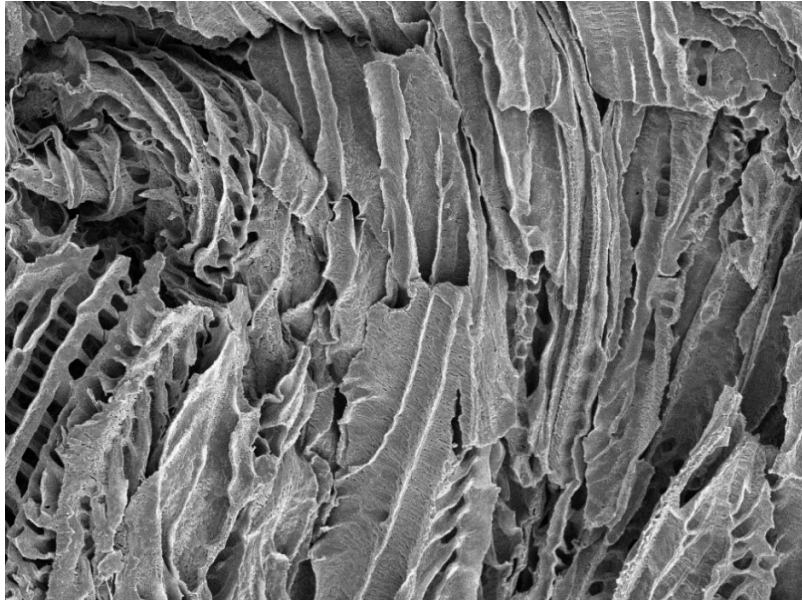


Ilustración 32. Detalle de los conductos compactos, en la parte ascendente del scaffold. Muestra Tipo 1, x200.

Una observación interesante en las paredes de los conductos (aparentemente compactos) es que también existe una porosidad sobre las mismas, de tamaño más reducido y menos uniforme, que le otorga un aspecto rugoso. Sin embargo, este efecto parece ser propio de los conductos más compactos (en la parte superior de la sección transversal), pues no se manifiesta esa porosidad de textura rugosa sobre las paredes de las hileras con mayor conectividad (más propia de la parte inferior de la sección).

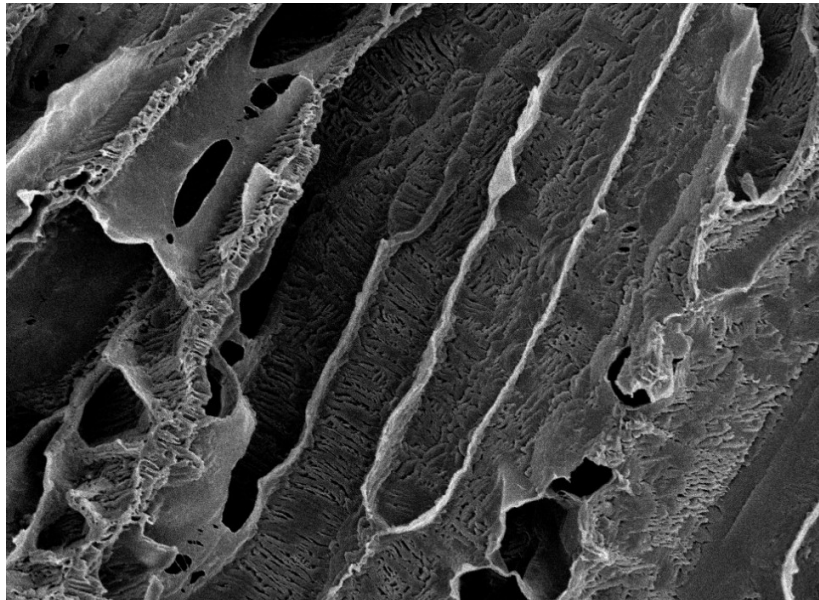


Ilustración 33. Detalle de la porosidad interna de las paredes de los conductos, en la porción superior de la sección. Muestra Tipo 2, x500.

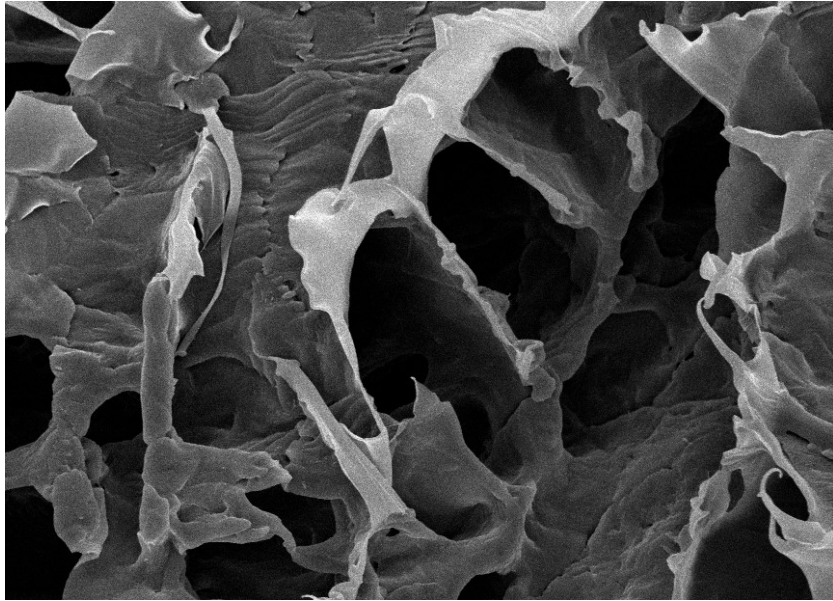


Ilustración 34. Detalle de los poros y las paredes lisas de las hileras, en la porción inferior de la sección. Muestra Tipo 3, x1000.

Finalmente, sin pretender ser exhaustivos con las medidas de las dimensiones de los poros, la última imagen nos brinda la posibilidad de medir adecuadamente las longitudes características de los dos tipos de poros que se visualizan en la imagen.

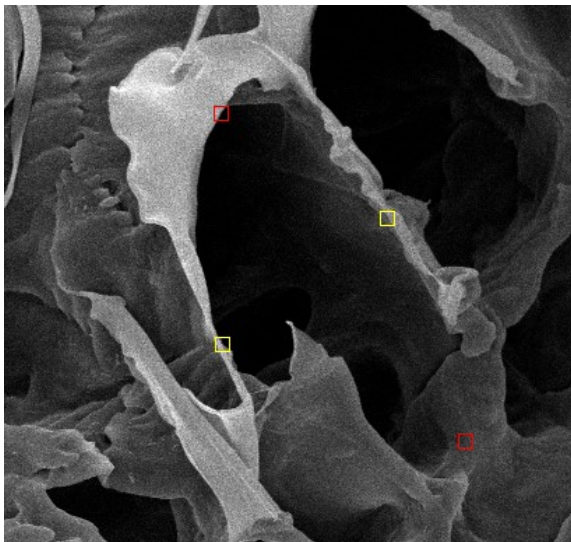


Ilustración 35. Medida sobre poro elíptico.

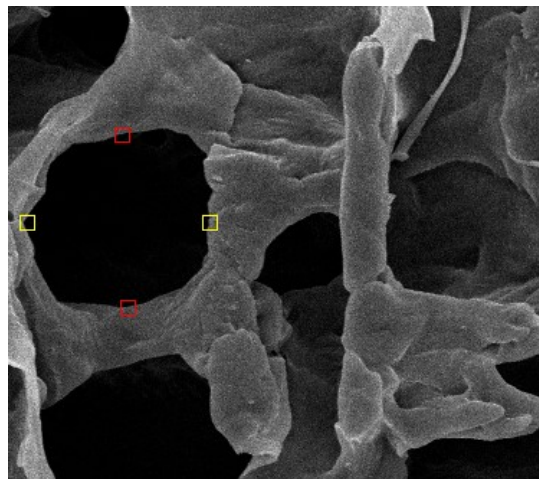


Ilustración 36. Medida sobre poro circular.

Para el poro más alargado, sus dimensiones se calcularon con un breve script de análisis de imagen (donde se seleccionaron los puntos de forma manual), encontrándose que el eje mayor (delimitado por los cuadrados en rojo) mide 35.20 micras, mientras que el eje menor (delimitado por cuadrados amarillos) mide 17.88 micras. En lo que respecta a los poros más reducidos y regulares en la imagen, sus dimensiones son 14.50 y 15.34 micras, para sus ejes en vertical y horizontal, respectivamente.

5.3. Propiedades mecánicas. Módulo elástico aparente

Los datos generados en el ensayo se ordenaron en un fichero Excel, fueron procesados para partir de los valores de tensión y deformación unitaria, para cada réplica a lo largo del tiempo, y posteriormente leídos desde Matlab. A cada conjunto de datos tensión-deformación unitaria se le realizó una regresión lineal, seleccionando previamente y de forma conservadora el grupo de datos que se correspondieran con la región lineal (deformación elástica de la sección aparente del scaffold, con los poros sin colapsar). Para ello, se consideró que los datos comprendidos entre el 10% y 50% del tiempo pertenecerían a dicha región.

No obstante, y con tal de aumentar el número de datos a contribuir en la regresión, se realizó nuevamente una segunda regresión lineal, con un conjunto nuevo de datos. Con tal de seleccionar los datos que más se ajustaran a un comportamiento lineal, se calculó el error individual de cada dato respecto a la primera recta de regresión, y se estableció un umbral a partir del cual, todo dato que tuviese un error inferior a dicho umbral pasaría a ser seleccionado para elaborar la segunda regresión.

Finalmente, con un ajuste presumiblemente más fino (pues al aumentar el número de datos, éste es más robusto), la pendiente de esta segunda recta de regresión representa el módulo de elasticidad de una réplica. Repitiendo dicho proceso, se obtuvieron los siguientes resultados de módulos de elasticidad en MPa:

		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Réplica 5	Media	Desv Tip
Factor 1	Control	2,427812	2,860801	2,050227	2,228136	1,818555	2,277106	0,396092
	0,1% GO	5,940929	4,069341	4,96292	5,898783	4,432964	5,060987	0,846108
	0,2% GO	6,233251	6,424926	5,068537	6,06855	5,944014	5,947856	0,523648
	0,5% GO	4,54257	5,448091	4,90111	5,513985	5,038172	5,088785	0,40188
						Media T.	4,593684	

Tabla 12. Valores de módulo elástico aparente (MPa) para cada réplica, su media y desviación típica.

A simple vista, y apoyándonos en la representación de *box and whiskers*, salta a simple las diferencias entre los módulos, especialmente al comparar la ausencia y presencia de GO en las muestras:

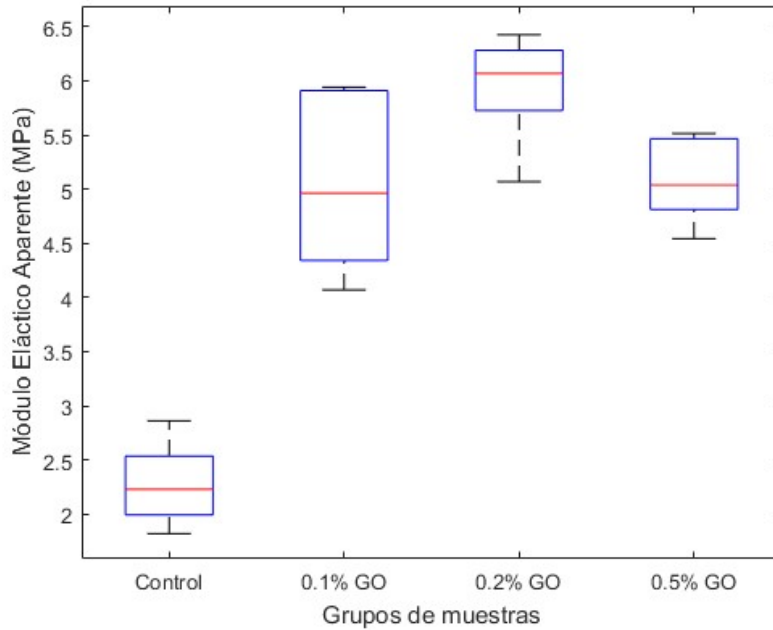


Ilustración 37. Diagrama box and whiskers del módulo de elasticidad aparente de cada tipo de muestra

En cualquier caso, realizando un ANOVA:

ANOVA	Suma de cuadrados	GDL	CM	F-ratio	F-Fisher	¿Sigue DIST. F?	
						A = 0,05	A = 0,01
Totalidad	43,55306114	19					
Factor 1 (entre grupos)	38,31905586	3	12,773	39,0463	1	No	No
Residual (interno a los grupos)	5,234005287	16	0,32713				

Tabla 13. ANOVA de los datos, siendo el tipo de muestra el factor de estudio en el módulo elástico aparente.

Puede concluirse que la cantidad de GO en las muestras afecta significativamente al módulo elástico aparente del scaffold.

Paralelamente, nos encontramos de nuevo con un efecto de vaivén, en la evolución del módulo elástico del material frente al aumento de la concentración de GO.

La hipótesis a proponer para tratar de justificar la disminución del módulo elástico con la máxima cantidad de GO es, acorde con lo mencionado en el análisis de resultados de porosidad, que la cantidad de GO es excedente y tiene a acumularse. Dichos aglomerados de láminas no transmiten ni distribuyen correctamente los esfuerzos, además de representar zonas de nucleación de grietas en el material, lo que se traduce en un empeoramiento de sus propiedades mecánicas.

Nota: Esta misma hipótesis es mencionada en el artículo [19], donde el módulo elástico de las muestras a distintas concentraciones de GO exhiben la misma dinámica.

5.4. Propiedades mecánicas. Módulo elástico, tensión de rotura y longitud de *plateau*

De manera equivalente a la primera fase del ensayo de compresión, los datos fueron volcados desde los ficheros de texto generados por el SW de adquisición a un Excel, donde se calculó la tensión y la deformación unitaria. En lo que respecta a la función que procesó los datos, su algoritmo se resume en los siguientes pasos:

- Se leen los datos de tensión y deformación unitaria de cada réplica (para un mismo tipo de muestra) del fichero Excel
- Se filtran para suavizarlas, disminuyendo el error de medida y posibles picos durante la puesta en marcha automática del ventilador de refrigeración
- Se seleccionan los datos de la zona del *plateau*, contenidos entre el 15% y el 40% de los datos
- Se seleccionan los datos de la zona de densificación, como aquellos que superen el 90% del valor máximo de tensión (conjunto muy reducido, pero perteneciente a la zona de máxima pendiente)
- Se realiza una primera regresión lineal con los datos de la zona de densificación
- Se calcula el error entre cada curva de tensión y los valores estimados por la regresión, y se seleccionan aquellos datos cuyo error es menor que un determinado umbral (con ello, se aumenta el número de datos eficientes para generar una nueva recta de regresión)
- Se halla una segunda regresión para los valores de tensión
- Se extraen los parámetros característicos de las curvas, de forma que la estimación del módulo elástico en bloque se corresponde con la pendiente de la segunda recta de regresión.
- Se seleccionan los datos que forman la zona del *plateau* mediante un umbral aplicado a la segunda derivada de las curvas, definiéndose otro umbral
- El valor máximo de dicho conjunto de datos se corresponde con el valor del límite del *plateau*/deformación plástica

- Dado que hay picos relacionados con la perturbación de la ventilación, la función implementa un criterio de rechazo de la actualización del conjunto de datos del plateau, de manera que si el valor a actualizar es inferior al máximo encontrado, se mantiene el máximo antiguo, siendo éste el límite para la deformación plástica.
- Los parámetros se almacenan en matrices
- Se representan las curvas de las 5 réplicas, para una muestra concreta, así como los puntos del límite del *plateau*.

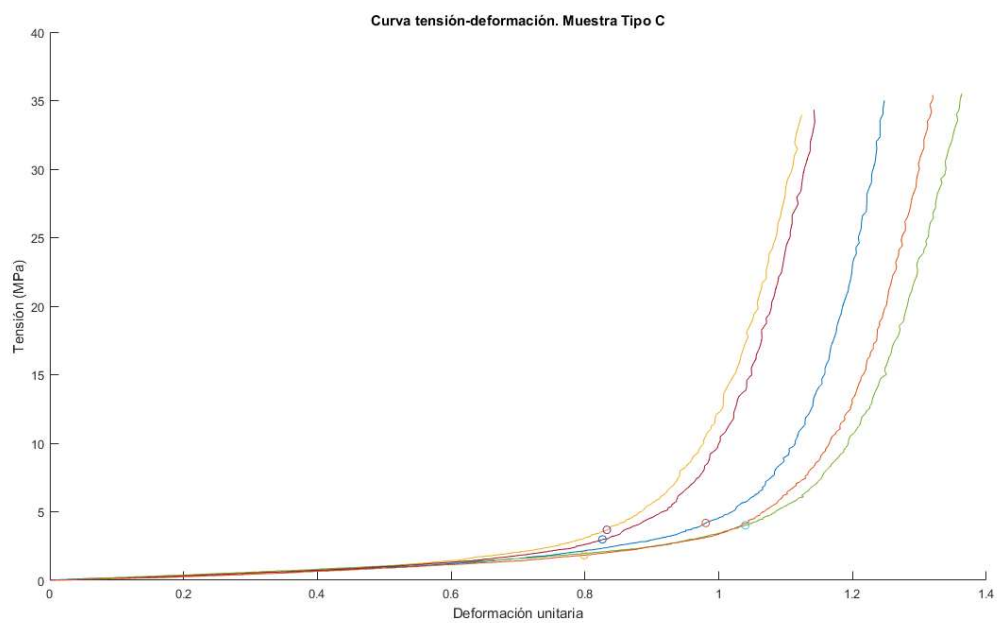


Ilustración 38. Curvas tensión-deformación para las muestras Tipo C.

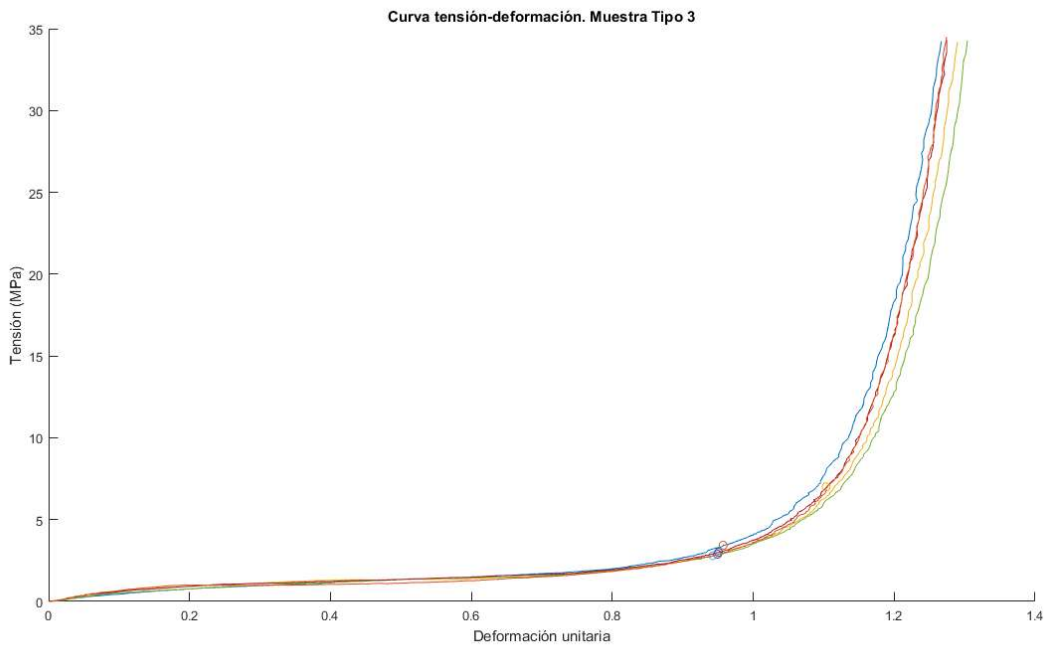


Ilustración 39. Curvas tensión-deformación para las muestras Tipo 3.

Los valores generados para todas las muestras se recogen en las siguientes tablas, en cuanto al módulo de elasticidad y el límite para la deformación elástica, respectivamente:

	E_bulk	r1	r2	r3	r4	r5	Media	Desv Tip
Factor 1	Control	247,4042	198,5565	183,3959	200,1673	212,9463	208,4940	24,1445
	1	206,6702	188,8291	184,8238	200,4174	205,3211	197,2123	9,864453
	2	253,6035	238,8356	223,3324	251,2892	268,7917	247,1705	17,05543
	3	255,2775	247,3218	285,4681	234,2973	272,2096	258,9149	20,22052
						Media T	227,9479	

Tabla 14. Valores del módulo elástico para cada réplica, con su media y desviación típica.

	e_limit	r1	r2	r3	r4	r5	Media	Desv Tip
Factor 2	Control	0,980543	0,791678	1,082784	0,815106	0,815106	0,8970	0,128453
	1	0,825649	0,812073	0,613507	0,633873	0,66018	0,7091	0,101707
	2	0,951778	0,812963	0,707539	0,730966	0,767279	0,7941	0,096716
	3	0,957295	0,988087	0,822776	1,004835	1,004835	0,9556	0,076728
							Media T	0,8389

Tabla 15. Valores del límite para la deformación plástica, con su media y desviación típica.

En general, las muestras Control (sólo con PCL) exhiben mayor variabilidad en sus propiedades mecánicas, conforme al tipo de ensayo realizado. Además, en ambos aparece un efecto valle de sus propiedades mecánicas en las muestras de Tipo 1, seguido de un ascenso conforme aumenta la cantidad de GO presente.

En el caso del módulo elástico de las muestras de Tipo 2 y 3, éstos ascienden de forma apreciable respecto de las muestras de Tipo C.

En la situación del límite del *plateau*, tan sólo la muestra Tipo 3 posee un aumento de dicho límite respecto de las muestras Tipo C. Dicha dinámica va en consonancia con la evolución de la porosidad de las muestras conforme el aumento de la cantidad de GO, radicando su lógica en que la extensión de dicha zona se corresponde con la cantidad de poros que colapsan durante esa fase del ensayo, tanto mayor cuanto mayor porosidad tenga el *scaffold*.

Una última observación es que, a razón de los resultados, conforme aumenta la cantidad de GO, las muestras poseen una deformación unitaria más uniforme.

Para una mejor visualización, se muestran a continuación los diagramas *box and whiskers* de ambos parámetros:

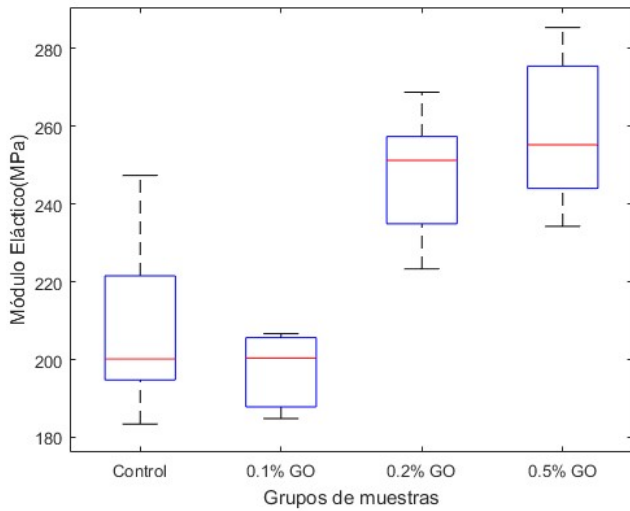


Ilustración 40. Diagrama box and whiskers del módulo elástico (MPa).

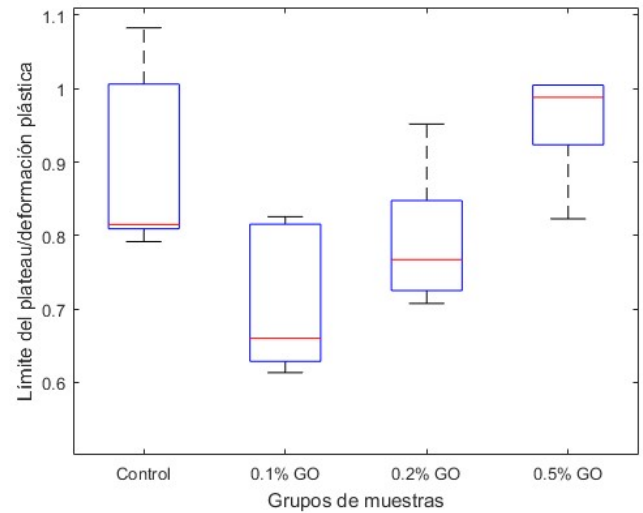


Ilustración 41. Diagrama box and whiskers del límite de plateau.

En cuanto al análisis estadístico, dada la alta variabilidad de los datos, especialmente en las muestras de Tipo C, se pasó a aplicar el criterio de exclusión de Chauvenet para datos que supusieran posibles *outliers* (considerando que los datos siguen una distribución normal). Para ello, se calcularon un límite superior otro inferior, mediante la media, desviación típica y el coeficiente de Chauvenet (en función del número de réplicas); donde deben permanecer todos los datos que aceptaremos como estadísticamente representativos, acorde a una distribución normal. Con lo mencionado, se expone a continuación los rangos de aceptación de datos para cada tipo de muestra:

Criterio de Chauvenet				
Kn (n=5)	1,65			
Módulo elástico	Control	1	2	3
Límites de rechazo	168,6556	180,936	219,029	225,551
	248,3325	213,4887	275,3119	292,2787

Tabla 16. Cálculos del criterio de Chauvenet, aplicados a los valores de módulo elástico.

Criterio de Chauvenet				
Kn (n=5)	1,65			
Límite <i>plateau</i>	Control	1	2	3
Límites de rechazo	0,685095	0,54124	0,634523	0,828965
	1,108991	0,876873	0,953687	1,082167

Tabla 17. Cálculos del criterio de Chauvenet aplicados a los valores de límite de *plateau*.

Viéndose que todos los datos están contemplados dentro de la variabilidad del conjunto, sin poder rechazar ninguno. Tras esta comprobación, se procedió con el ANOVA de cada factor (parámetro mecánico):

ANOVA Módulo Elástico	Suma de cuadrados	GDL	CM	F-ratio	F-Fisher	¿Sigue DIST. F?	
						A = 0,05	A = 0,01
Totalidad	18778,02695	19					
Factor 1 (entre grupos)	2651,588659	3	883,863	2,56188	0,9088	Sí	Sí
Residual (interno a los grupos)	5520,0837	16	345,005				

Tabla 18. ANOVA de los datos, siendo el tipo de muestra el factor de estudio en el módulo elástico.

ANOVA límite def. elástica	Suma de cuadrados	GDL	CM	F-ratio	F-Fisher	¿Sigue DIST. F?	
						A = 0,05	A = 0,01
Totalidad	0,347630271	19					
Factor 1 (entre grupos)	0,03585745	3	0,01195	1,13601	0,63561	Sí	Sí
Residual (interno a los grupos)	0,1683	16	0,01052				

Tabla 19. ANOVA de los datos, siendo el tipo de muestra el factor de estudio en el límite de *plateau*.

Resultando que no es posible demostrar la dependencia entre el módulo elástico ni el límite para la deformación elástica con respecto a la cantidad de GO, conforme se ha realizado el experimento y el número de muestras empleadas; si bien el valor del F-ratio es relativamente alto en el ANOVA del módulo elástico, como para situar la hipótesis nula cerca del límite de decisión para su aceptación (pues puede

apreciarse el salto del valor medio del módulo elástico entre las muestras Tipo 2 y 3 respecto de las muestras C y 1).

5.5. Topografía de las muestras con HAp. Imágenes de FESEM

En primer lugar, tomas las imágenes de FESEM se realizaron sobre la cara superior de las muestras, para limitar el número de las mismas a observar.

El resultado general es que, incluso a las 12 horas de inmersión en x5 SBF, existe un crecimiento de HAp sobre el scaffold, en su cara superior. Además, también está presente en las muestras dos tipos de crecimientos de HAp; una nucleación temprana, en la que se forman cristales esféricos de grandes dimensiones, las cuales pueden aparecer desprendidas (asociado al lavado y secado de las muestras), y un crecimiento más progresivo de la HAp, en forma de esferas más pequeñas que llegan a coalescer, formando un manto de HAp que oculta la estructura polimérica del scaffold.

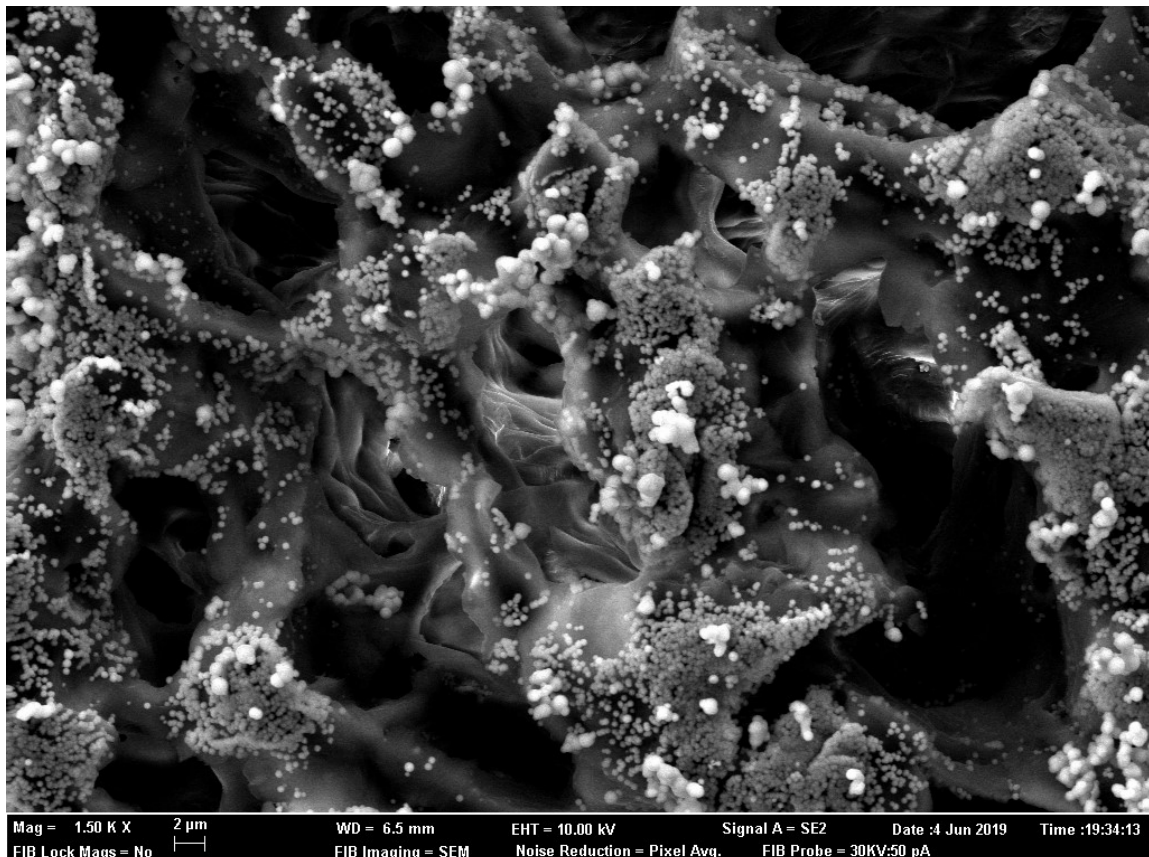


Ilustración 42. Vista general de la distribución de HAp en el scaffold. Muestra Tipo 3, a las 12 horas de incubación, x1500.

En algunas de las muestras, los cristales de HAp forman una capa que cubre toda la superficie del polímero, mostrándose incluso las grietas de la fractura de dicha capa que debió suceder durante su manipulación.

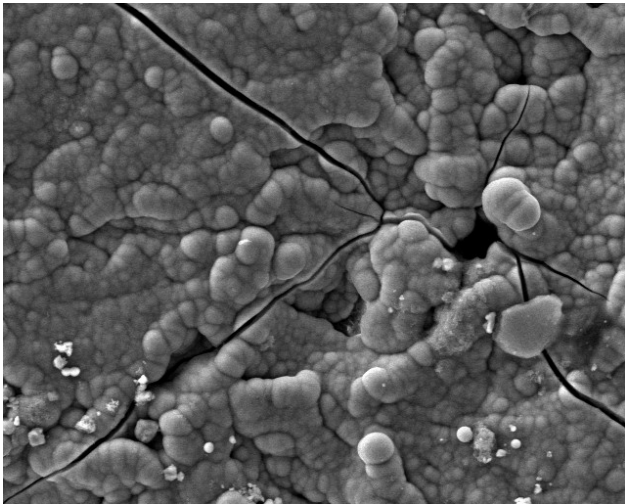


Ilustración 43. Recubrimiento de HAp con fractura. Muestra Tipo 1, a las 12 horas de incubación, x1000.

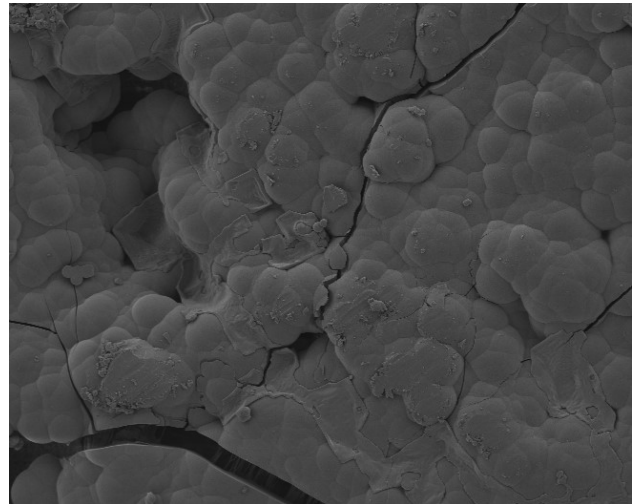


Ilustración 44. Recubrimiento de HAp con fractura. Muestra Tipo 2, a 1 día de incubación, x1000.



Ilustración 45. Detalle de los dos tipos de cristales de HAp. Muestra Tipo C, a 1 día de incubación, x10.000.

Sin embargo, se encontraron enormes heterogeneidades del crecimiento de HAp a lo largo de la superficie en determinadas muestras, a consecuencia de la formación de sales extrañas, pues difieren en topografía y composición (confirmado por análisis elemental, apartado en el que se detallará más adelante).

5.6. Análisis elemental. Ratio Ca/P

Para cada imagen tomada, se realizó un análisis elemental sobre las áreas identificadas como posibles cristales de HAp. A partir de éstas, se almacenaron los valores de porcentaje atómico de Ca y P, y se halló la ratio Ca/P para cada muestra y tiempo, con el propósito de compararlo con las ratios de HAp estequiométrica y biológica. Con todo ello, se obtuvo la siguiente tabla de resultados:

		Ca (Atom. %)	P (Atom. %)	Ca/P	Ca/P Estq.	Ca/P Bio.	Ca/P - EstqRef	Ca/P - BioRef
t1/2= 12 h	Control	16,62	9,02	1,843	1,67	1,93	0,176	-0,088
	0,1 GO%	12,13	7,3	1,662			-0,005	-0,269
	0,2% GO	10,36	6,88	1,506			-0,161	-0,424
	0,5% GO	11,12	6,33	1,757			0,090	-0,174
t2= 2 días	Control	6,58	3,39	1,941			0,274	0,011
	0,1% GO	11,04	6,07	1,819			0,152	-0,111
	0,2% GO	6,5	3,37	1,929			0,262	-0,001
	0,5% GO	9,39	4,55	2,064			0,397	0,134

Tabla 20. Cálculos de la ratio Ca/P para muestras a 12 horas y 2 días de incubación en x5 SBF.

A continuación, y para una mejor visión de conjunto, se muestran dos gráficas en las que se compara la diferencia de ratios respecto a las referencias estequiométricas y biológicas, para ambos tiempos:

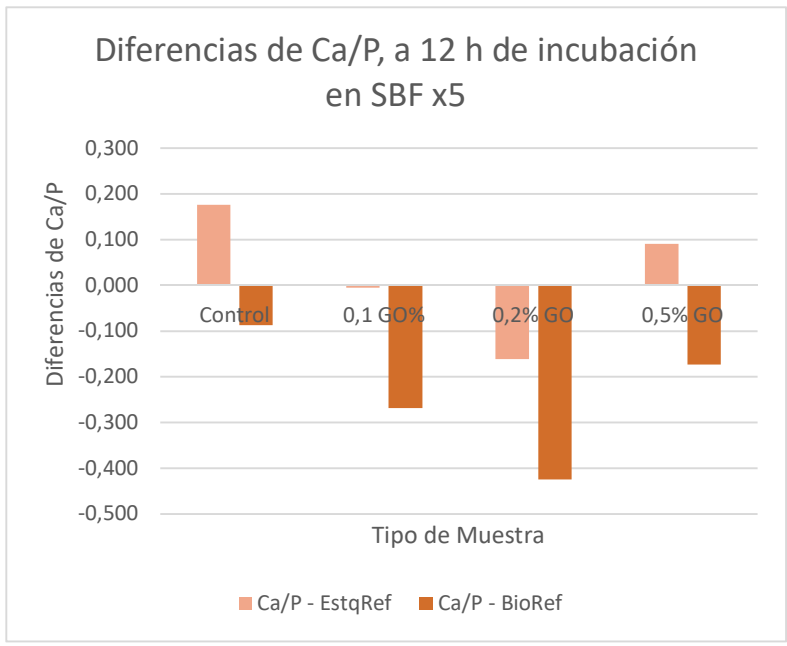


Ilustración 46. Diferencias de Ca/P, a las 12 horas de incubación.

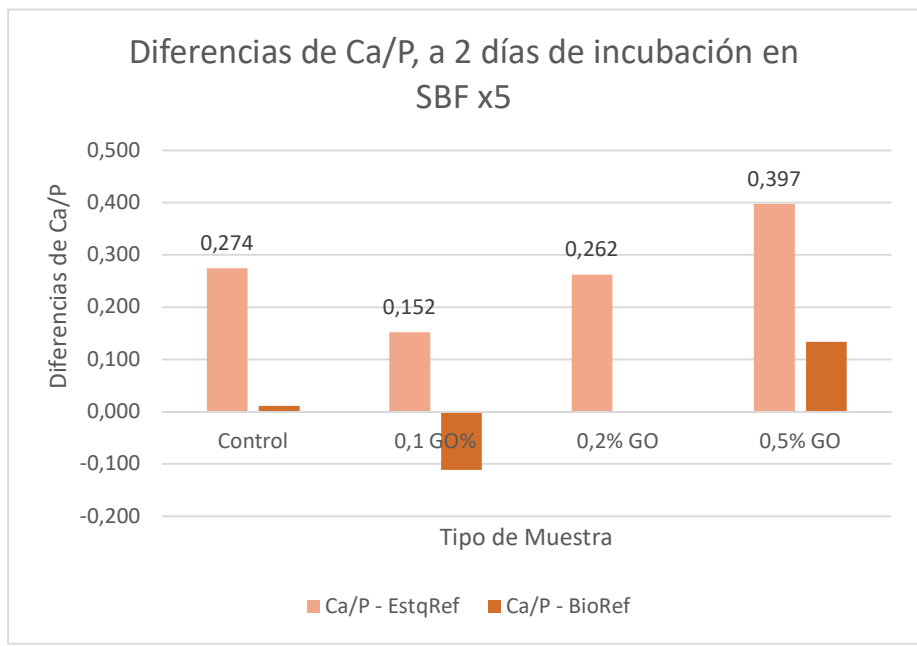


Ilustración 47. Diferencias de Ca/P, a los 2 días de incubación.

A la luz de los resultados, si bien el número de muestras no permite deducir con representatividad las posibles diferencias de las ratios Ca/P con la concentración de GO, sí que se puede apreciar que, conforme al salto de 12 horas a 2 días de incubación, aumenta la ratio Ca/P, y con ello, la tendencia a formarse HAp biológica.

En relación con lo comentado en el apartado anterior sobre la formación de sales extrañas, el análisis elemental nos revela que aparecieron principalmente sales con una inesperada abundancia en magnesio y algo de sodio, así como agregaciones casi puras en calcio. En detalle:

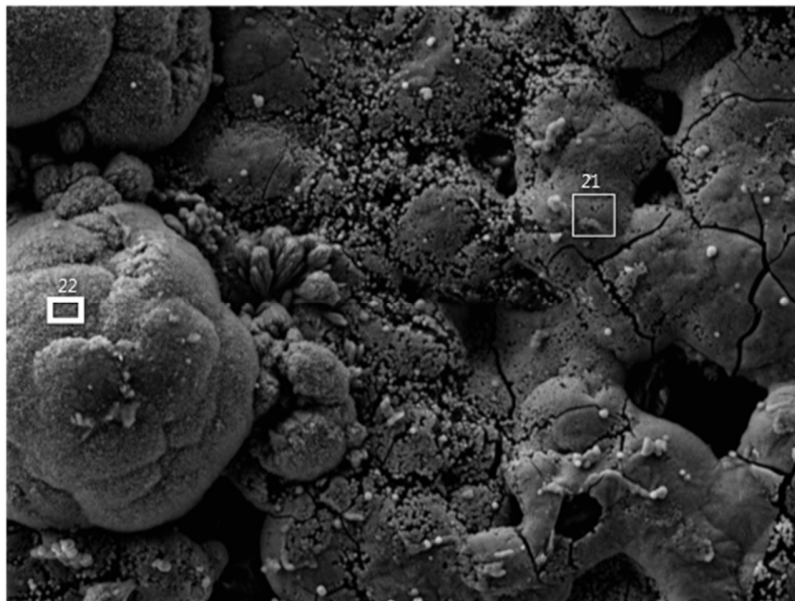


Ilustración 48. Distribución de HAp en torno a una sal extraña. Muestra Tipo 3, a 2 días de incubación, x1000.

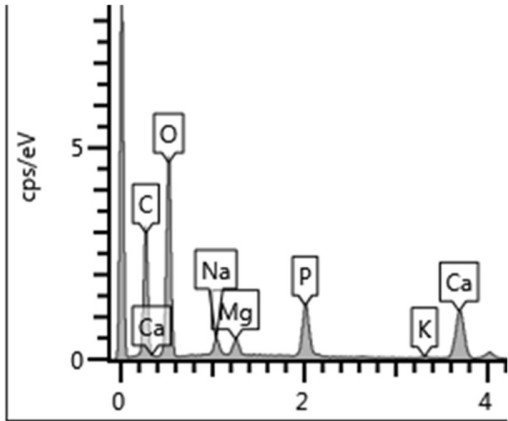


Ilustración 49. Espectro elemental nº 21, sobre un cristal de HAp. Muestra Tipo 3, a 2 días de incubación.

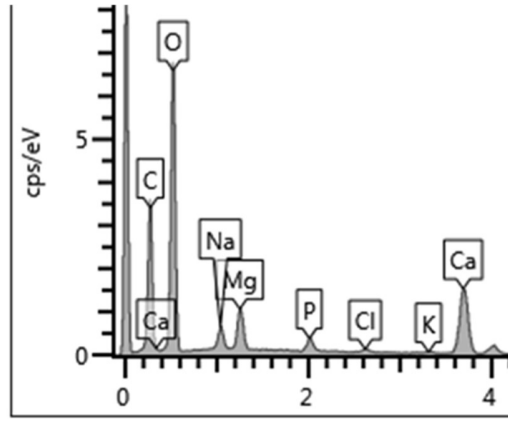


Ilustración 50. Espectro elemental nº 22, sal extraña basada en Mg, Na y Ca. Muestra Tipo 3, a 2 días de incubación.

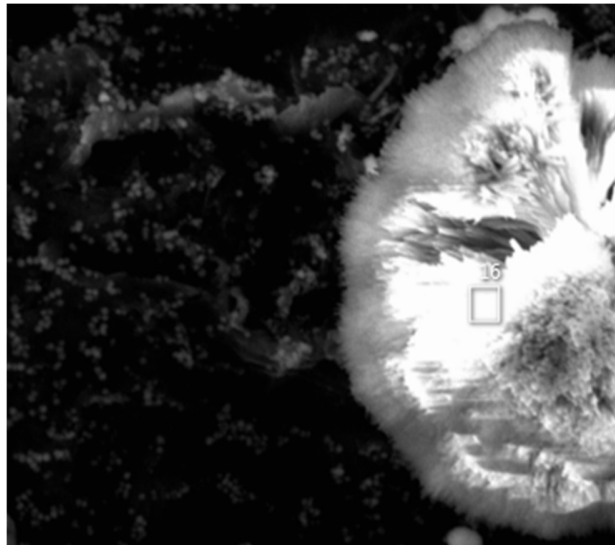


Ilustración 51. Detalle de una sal extraña de Mg, Na y Ca. Muestra Tipo 1, a 2 días de incubación, x5000.

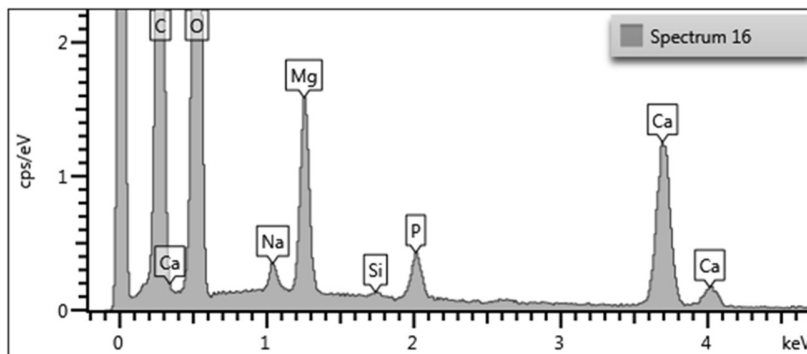


Ilustración 52. Espectro elemental nº 16, sal extraña basada en Mg, Na y Ca. Muestra Tipo 1, a 2 días de incubación.

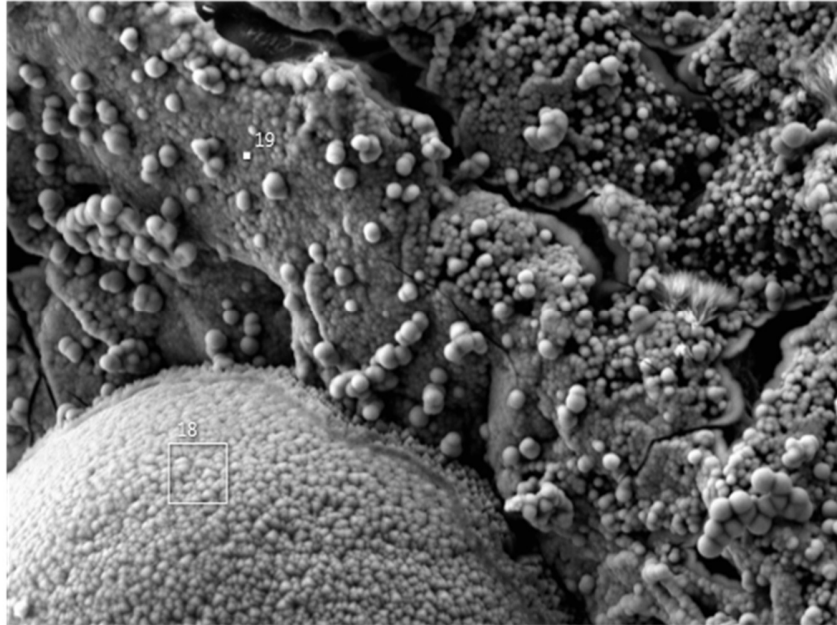


Ilustración 53. Manto de HAp, en torno a una acumulación anormal de Ca. Muestra Tipo 1, a 2 días, x1500.

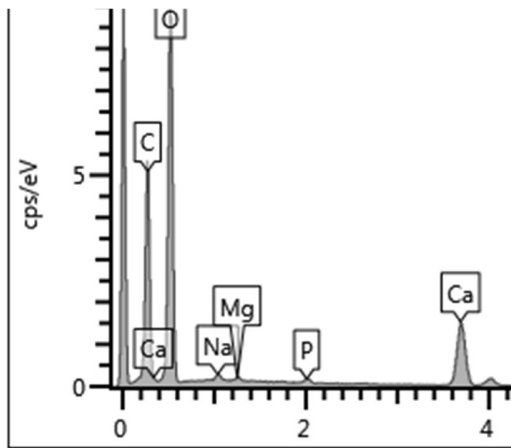


Ilustración 54. Espectro elemental nº 18, sobre una acumulación anormal de Ca. Muestra Tipo 1, a 2 días.

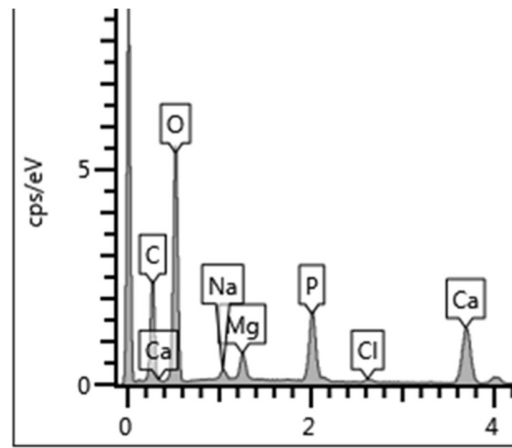


Ilustración 55. Espectro elemental nº 19, sobre el manto de HAp. Muestra Tipo 1, a 2 días.

Con tal de evidenciar la heterogeneidad interna de la distribución de HAp, se tomaron dos imágenes de una misma muestra, las cuales se corresponden con las dos últimas imágenes mostradas. La primera está hecha sobre la parte central, algo despoblada de HAp (con esferas de un tamaño bastante menor, y por ende más recientes) y con sales extrañas basadas en magnesio y calcio. Mientras, la segunda

imagen está tomada en el borde de la muestra, donde se halla un manto de HAp y una acumulación anormal de calcio en la esquina inferior izquierda.

La hipótesis con la que se persigue justificar estas diferencias es que las sales extrañas representan un acumulo de calcio que priva de parte de la formación de HAp a lo largo de la superficie del polímero, es decir, que los iones calcio sean limitantes en cuanto a la formación de cristales de HAp. De hecho, de ser cierta la hipótesis, la primera de las imágenes ilustra cómo la presencia de una sal extraña que acumula calcio supone una disminución de las esferas de HAp en sus alrededores, mientras que a mayores distancias, se observa la coalescencia de las esferas de HAp, hasta formar un manto que recubre la superficie polimérica.

5.7. TGA. Cantidad de componente mineral

Los resultados del análisis termogravimétrico se muestran en la siguiente tabla, siendo los valores de masa en t0 los valores de referencia para el cálculo de masa mineral en las muestras:

TGA	m_total_t0	m_t0 (mg)	m_total_t4	m_t4 (mg)	Δm (mg)	Δm_{norm} (mg)
Control	5,045	0,0259	5,634	0,0979	0,0720	0,012236819
1	3,725	0,0439	5,057	0,1618	0,1179	0,020210128
2	5,780	0,0389	6,063	0,2829	0,2440	0,039929317
3	6,472	0,0279	9,512	0,6239	0,5960	0,061287266

Tabla 21. Cálculo de la masa de componente mineral de las muestras, por TGA.

La evolución de la masa mineral en los scaffolds (evaluada como las diferencias de las masas minerales relativas al peso inicial, Δm_{norm}) crece de forma evidente conforme aumenta la cantidad de GO en la muestra, lo cual va en consonancia con el efecto del GO como agente nucleante de la HAp. Si bien en otros ensayos, se manifestaba un efecto valle debido a la posible acumulación de láminas de GO, éste mismo sería el responsable de una nucleación de mayor cantidad de HAp en las muestras Tipo 3, pese a que el GO no se encontrase debidamente incorporado en la estructura de la PCL.

5.8. FTIR. Enlace entre PCL y GO

Los valores de las curvas de absorbancia de FTIR de las muestras a tiempo t0, almacenados en ficheros .txt, fueron procesados por un *script* para su visualización y detección de picos característicos. En forma de tabla, se muestran a continuación los valores de los picos normalizados, así como las longitudes de onda en las que se dan; además, también se muestran en una segunda tabla los valores incrementales en la absorbancia y los desplazamientos de las longitudes de onda en la que aparecen los picos:

	Tipo de enlace	C=O carboxyl	C=C	C-O carboxyl	C-O epoxy	C-O alkoxy
	Referencia (cm-1)	1718	1630	1312	1152	1026
Control	Lambda (cm-)	1721,4138	1649,25873	1292,60653	1168,91212	1045,21772
	Absorbancia N.	1	0,017244151	0,22970764	0,665943136	0,280890747
0,1% GO	Lambda (cm-)	1721,4138	1647,19716	1292,60653	1164,78898	1045,21772
	Absorbancia N.	1	0,021367351	0,248740947	0,738010763	0,332509468
0,2% GO	Lambda (cm-)	1721,4138	1649,25873	1292,60653	1162,7274	1045,21772
	Absorbancia N.	1	0,042018507	0,277406774	0,780377872	0,390087753
0,5% GO	Lambda (cm-)	1721,4138	1649,25873	1292,60653	1164,78898	1045,21772
	Absorbancia N.	1	0,037511454	0,27740898	0,752398227	0,379452849
	Absorbancia N.		0,159713522	0,103876433	1	

Tabla 22. Valores de absorbancia y longitudes de onda en los picos característicos de las muestras.

Tipo de enlace		-CH2- alcan	-CH2- alcan	COO-O esther
Referencia Control (cm-1)		2943,93	2865,59	1721,41
0,1% GO	Shift (cm-)	0,00	0,00	0,00
	Abs_dif (%)	1,42	0,97	0,00
0,2% GO	Shift (cm-)	0,00	0,00	0,00
	Abs_dif (%)	2,13	2,39	0,00
0,5% GO	Shift (cm-)	0,00	0,00	0,00
	Abs_dif (%)	1,73	1,71	0,00

Tipo de enlace		C=O carboxyl	C=C	C-O carboxyl	C-O epoxy	C-O alkoxy
Referencia Control (cm-1)		1721,41	1649,26	1292,61	1168,91	1045,22
0,1% GO	Shift (cm-)	0,00	-2,06	0,00	-4,12	0,00
	Abs_dif (%)	0,00	0,41	1,90	7,21	5,16
0,2% GO	Shift (cm-)	0,00	0,00	0,00	-6,18	0,00
	Abs_dif (%)	0,00	2,48	4,77	11,44	10,92
0,5% GO	Shift (cm-)	0,00	0,00	0,00	-4,12	0,00
	Abs_dif (%)	0,00	2,03	4,77	8,65	9,86

Tabla 23. Valores de absorbanza y longitudes de onda en los picos característicos de las muestras.

A la luz de los resultados, los cambios más notables en absorbanza con respecto a los valores de la muestra Tipo C se encuentran en las zonas de 1168 y 1045 cm^{-1} , correspondientes a los enlaces C-O epoxy y alcoxi, respectivamente. Estos enlaces están presentes en el GO, particularmente los enlaces de los grupos epoxy que son exclusivos de esta estructura, por lo que su aumento puede relacionarse con la mayor presencia de GO en la muestra. Sin embargo, las absorbanzas de enlaces de grupos epoxy y alcoxi disminuyen en la muestra Tipo 3, lo cual podría tener relación con la aglomeración de capas de GO por saturación en dicha muestra, de forma que esta asociación tuviera un efecto en las energías de enlace intermolecular entre capas que disminuyera el valor de los picos mencionados a dichas longitudes de onda.

También se detectó este fenómeno de valle, en menor medida, en los valores de absorbanza diferencial para los enlaces de tipo $-\text{CH}_2-$, C=C y C-O carboxílico. No obstante, sólo aparecen desplazamientos notables de longitudes de onda en las zonas de enlaces epoxy.

Para entender lo sucedido y poder concluir si ha habido enlace molecular entre las estructuras de PCL y GO, cabe recurrir a la inspección de las curvas de FTIR siguientes, prestando atención en las regiones cercanas a la base que engloba las longitudes 1734, 1721 y 1700 cm^{-1} ; así como en la zona de enlaces 1293 y 1157 cm^{-1} , correspondientes a los ya mencionados enlaces carboxilo y epoxy, propios del GO.

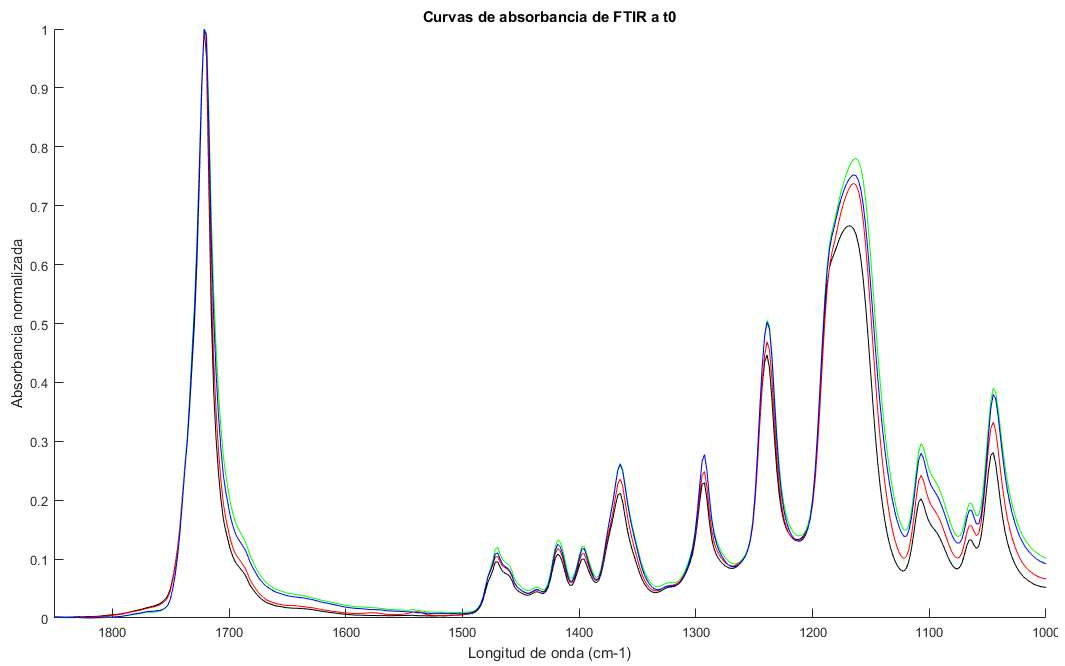


Ilustración 56. Curvas de absorbanza de FTIR, rango de longitudes de onda 1850 a 1000 cm-1.

Siendo las curvas negra, roja, verde y azul las correspondientes a las muestras Tipo C, 1, 2 y 3, respectivamente.

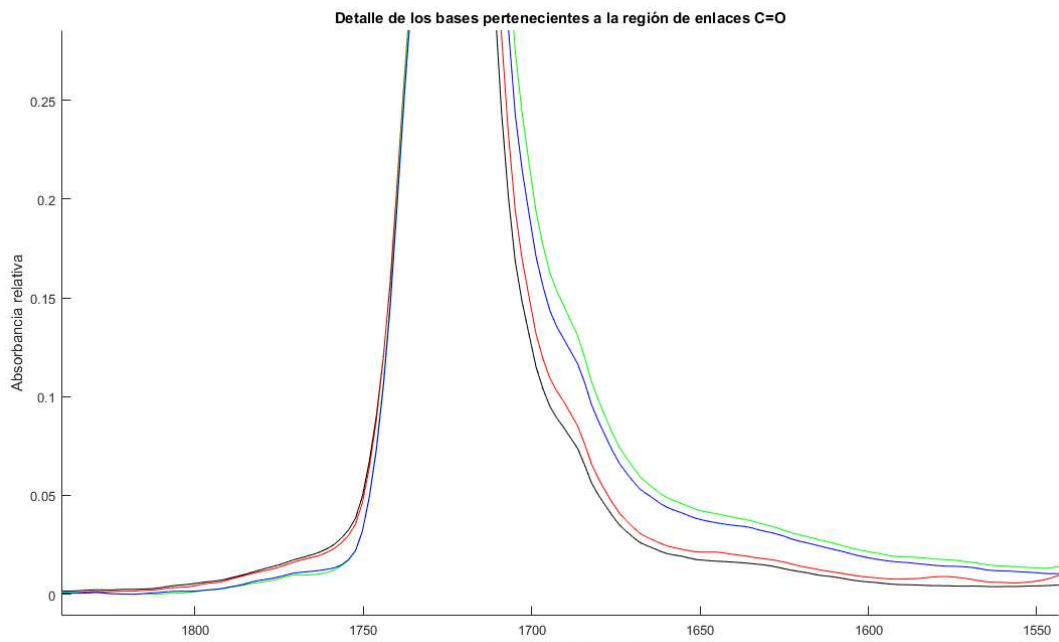


Ilustración 57. Detalle de la base, entorno a la longitud de onda 1721 cm-1.

En el detalle de la base en torno al pico de 1721 cm^{-1} , se aprecian dos efectos especialmente diferenciadores entre los grupos de muestras {C,1} y {2,3}. El primer efecto es la disminución de las curvas verde y azul (muestras Tipo 2 y 3) en el codo de la izquierda por donde asciende el pico, mientras que el segundo efecto es la elevación de dichas curvas por encima del codo del pico situado a la izquierda. Es sabido que estas variaciones se corresponden con cambios en la cristalinidad de la PCL inducida por la presencia del GO, en particular, la disminución del codo izquierdo representa una disminución de la fase amorfa de la PCL, así como una elevación del codo derecho representa un aumento de su fase cristalina [20]. Por ello, la manifestación de estos dos efectos demuestra que el GO se ha unido a la estructura de la PCL, aumentando su cristalinidad, y en mayor medida para una concentración del 0,2% de GO en peso (siendo la unión ligeramente menor para una concentración del 0,5% de GO en peso).

Además, los cambios en la región epoxi también están correlacionados con la presencia de GO en la estructura. En el mismo artículo, se pone de manifiesto que la PCL presenta dos picos en esa zona, y que a medida que aumenta la cantidad de GO presente, dichos picos se fusionan en uno sólo. Este efecto también puede apreciarse ligeramente, en el detalle de los picos en esta zona:

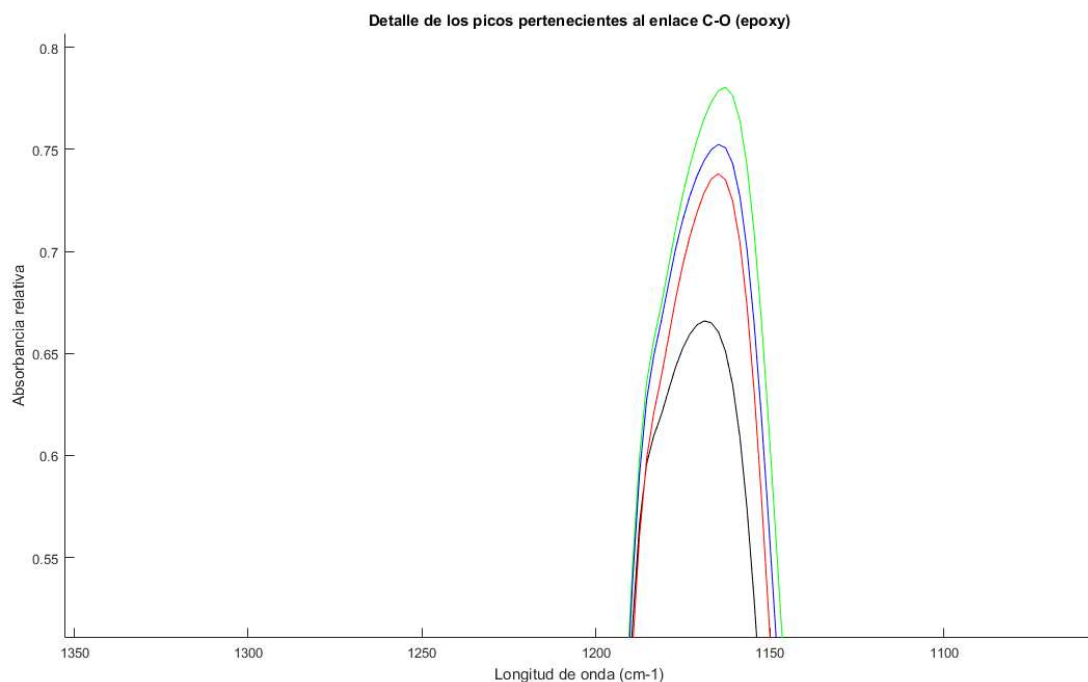


Ilustración 58. Detalle del doble pico característico de la PCL, y su fusión con la presencia de GO.

6. Conclusiones

Se consiguió fabricar con éxito las muestras híbridas de PCL y GO, con las proporciones de 0.1, 0.2 y 0.5% en peso de GO, además de la muestra control, mediante la técnica de *Freeze Extraction* y empleando dioxano como disolvente común para ambas sustancias. Las muestras fueron troqueladas para los distintos ensayos de caracterización, adquiriendo unas dimensiones de 2-3.5 mm de altura, 4 mm de diámetro y una porosidad media entorno al 73% (respecto del 85% teórico).

De la inspección visual se aprecia diferencias entre la base, donde se manifestó un notable efecto piel, y la cara superior. Dicha observación es confirmada por imágenes de SEM, donde en la cara inferior existe una mayor superficie de material compacto y poros cerrados. Las imágenes de SEM en sección transversal revelan una estructura de poros, con dimensiones de poro sin traccionar entre 15 y 35 micras, con una alta interconexión y una organización que muestra la evacuación del solvente por la estructura.

De los ensayos mecánicos se extrae que la cantidad de GO en las muestras afecta significativamente al módulo elástico aparente del scaffold, con un máximo en la muestra Tipo 2, con un aumento medio del 260% con respecto a la media del módulo elástico para las muestras control; sin embargo, por la cantidad de muestras y las condiciones en las que se realizó el ensayo, no existe evidencia de que la cantidad de GO provoque un aumento del módulo elástico de la muestra en bloque (durante la compresión en su fase de densificación), sin haber tampoco correlación entre la cantidad de GO y el límite del *plateau*.

En cuanto al ensayo de bioactividad, se preparó el SBF x5 sin precipitaciones de sales aparentes en el medio, realizándose el ensayo con las muestras incubadas en un horno a 37 °C, las cuales pasaron a ser observadas a las 12 horas, 2, 3 y 6 días. Las imágenes de FESEM sobre la cara superior muestran que, incluso a las 12 horas de inmersión en x5 SBF, existe un crecimiento de HAp sobre el scaffold, con un crecimiento rápido con esferas de grandes dimensiones y otro más progresivo. También se detectaron algunas sales extrañas que producían heterogeneidades considerables en el crecimiento de HAp sobre la superficie del scaffold. En lo que respecta a la ratio Ca/P, las muestras se encuentran en el rango entre 1.5 (fosfato tricálcico) y 2 (superior a HAp biológica), apreciándose que, conforme al salto de 12 horas a 2 días de incubación, aumenta la ratio Ca/P, y con ello, la tendencia a formarse HAp biológica.

Los resultados de TGA evidencian un crecimiento de la cantidad de componente mineral en las muestras conforme aumenta la cantidad de GO presente, lo que corrobora la capacidad del GO como agente nucleante de la HAp.

De las gráficas de FTIR se puede intuir cambios en la cristalinidad de las muestras por determinadas modificaciones en la base entorno a la longitud de onda 1721 cm^{-1} y el doble pico característico de la PCL por la zona de longitudes de onda 1160 cm^{-1} , lo cual se asocia a la presencia de GO en la estructura, existiendo mayor señal de cambio para la muestra Tipo 2.

7. Perspectivas de futuro

Las perspectivas a largo plazo parecen prometedoras, en el sentido en el que el GO como material junto con polímeros ha despertado la curiosidad en el ámbito de la ingeniería tisular, entre muchos otros. Su método de síntesis y preparación resulta más sistematizable que en el caso del grafeno, y el uso que se le puede otorgar como material cubre los propósitos de mejorar las propiedades mecánicas de los biomateriales, así como proporcionarles mayor hidrofiliidad, y lo que es más importante, facilitar su funcionalización; ya sea bien para mejorar el reconocimiento y diferenciación celulares, bien para cargar y liberar sustancias específicas en entornos microbiológicos concretos (véase para la liberación controlada de fármacos).

En lo que respecta a las vistas a corto plazo de este tipo de proyectos, es necesario integrar la literatura científica en torno a las aplicaciones del GO. Por ello, quisiera mencionar las propuestas generales de mejora que tendría que contemplar este trabajo.

Las propuestas de mejora son múltiples, apuntando a dos dimensiones claras:

1. Ampliar la caracterización del scaffold para cubrir todos los criterios mencionados
2. Plantear un protocolo para sistematizar la fabricación de los scaffolds de PCL con GO, consiguiendo una mayor homogeneidad en la fabricación de las muestras, y que éste permita una mayor escalabilidad, lo cual puede llevar a plantear cambios en los métodos de preparación y fabricación de los scaffolds.

Finalmente, de ser abordada la unificación de estudios completos del GO como material en aplicaciones de ingeniería tisular, no resultará extraño verlo en un futuro en las aplicaciones ya citadas.

8. Anexos

8.1. Información técnica sobre los equipos

8.1.1. Balanza analítica de precisión

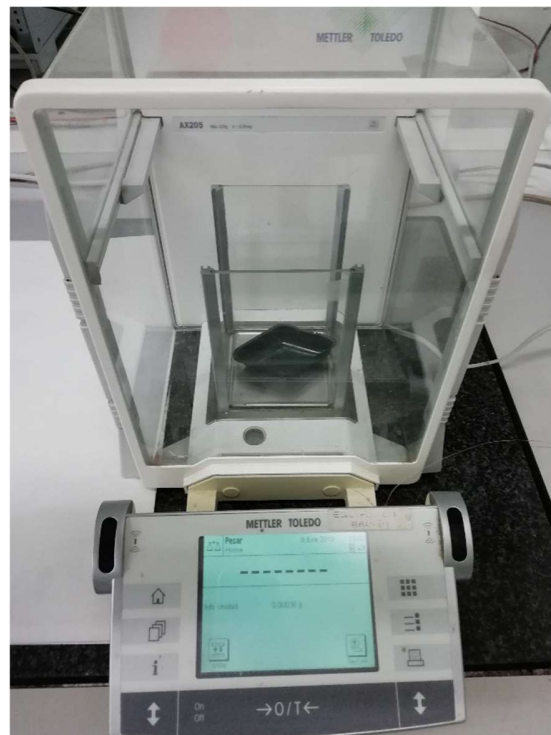


Ilustración 59. Balanza analítica de precisión.

Nombre del equipo	Balanza analítica de precisión
Marca y modelo	XS105DU
Capacidad máxima de pesado	120g/41g
Resolución	0,1mg; 0,01 mg

Repetibilidad	0,02 mg (a 5g)
Repetibilidad típica	0,01 mg
Ajuste	Interno/FACT
Dimensiones del plato de pesaje	78 mm
Tiempo de estabilización	1,5 s
Linealidad	±0,2 mg
Dimensiones (alto x ancho)	322 x 263 mm

8.1.2. Estufa de precisión universal



Ilustración 60. Estufa de precisión universal.

Nombre del equipo	Estufa de precisión universal
-------------------	-------------------------------

Marca y modelo	DIGITRONIC 1451 referencia: 2005161
Dimensiones (alto x ancho x largo)	70 x 95 x 72 cm
Peso	74 kg
Capacidad	145
Dimensiones internas (alto x ancho x largo)	50 x 58 x 50
Consumo	2000 W
Regulación de temperatura	Digital con microprocesador
Distribución del calor	Aire forzado
Temperatura máxima	250 °C
Temperatura mínima	Temperatura ambiente + 5 °C
Estabilidad	±0,25 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 a 100 °C	17 min
Tiempo de recuperación	10 min
Renovaciones de aire	12 renovaciones/hora
Suministro de energía eléctrica	115-230V; 50-60 Hz

8.1.3. Bomba de vacío de aceite



Ilustración 61. Bomba de vacío de aceite.

Nombre del equipo	Bomba de vacío de aceite
Marca y modelo	Vaccubrand 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	4 x 10 ⁻⁴ mbar
Vacío definitivo (total) sin lastre de gas	2 x 10 ⁻³ mbar
Dimensiones (largo x ancho x alto)	308 x 122 x 160 mm

8.1.4. Desecador



Ilustración 62. Desecador.

Nombre del equipo	Desecador
Marca y modelo	JP Selecta, Vacuo-Temp
Vacío máximo	0,76 bar
Calefacción	Tº ambiente a 170 ºC
Volumen	3 L
Diámetro de la placa calefactora	23,5 cm
Dimensiones (alto x ancho x largo)	17 x 28 x 34 cm
Consumo	540 W

Peso	9 kg
Estabilidad	± 1 °C
Precisión	± 1 °C

8.1.5. Sonicador de varilla

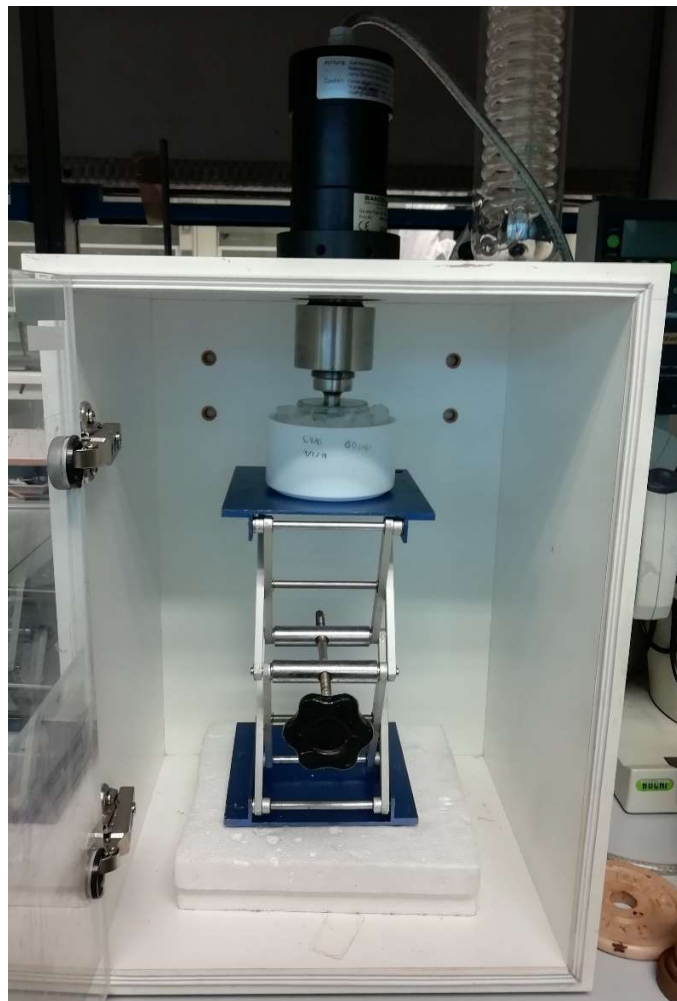


Ilustración 63. Sonicador de varilla.

Nombre del equipo	Sonicador de varilla
Marca y modelo	Bandelin, HD 2200.2
Máx. capacidad	20-900 mL
Potencia máxima	200 W
Tipo de sonda	Ti TT 13, 13 mm de diám.
Generador US	GM 2200,2
Convertidor US	UW 2200
Frecuencia de operación	20 kHz

8.1.6. Centrífuga 5804R



Ilustración 64. Centrífuga 5804R.

Nombre del equipo	Centrífuga
Marca y modelo	Eppendorf 5804R
Máx. FCR	20913 x g
Rango de velocidad	20-14000 rpm
Rotores disponibles	12
Nº programas	35 programas definidos
Temporizador	1-99 min
Nivel de ruido	<58 dB
Dimensiones (Ancho x Profundo x Alto)	64 x 55 x 34 cm
Altura con tapa abierta	74 cm
Peso	80 kg
Enfriamiento	Sí
Rango control de Tª	-9 °C a 40 °C
Alimentación eléctrica	230 V, 50-60 Hz
Consumo máx. energía	1650 W
Máx capacidad	4 x 250 mL/ 2 x 500 MTP

8.1.7. Baño de Ultrasonidos



Ilustración 65. Baño de ultrasonidos.

Nombre del equipo	Baño de ultrasonidos
Marca y modelo	USC 600 TH
Capacidad	5,4 L
Potencia US eficaz	120 W
Potencia de calentamiento	400 W
Dimensiones internas (ancho x profundidad x altura)	300 x 150 x 150 cm
Dimensiones externas (ancho x profundidad x altura)	325 x 175 x 295 cm

Categoría nº	142-0091
Frecuencia	45 kHz
Calentador de tanque	20 a 80 °C
Temporizador digital	1-99 min

8.1.8. SEM JEOL JSM 6300



Ilustración 66. Columna de SEM.

Nombre del equipo	SEM
Marca y modelo	JEOL JSM 6300
Voltaje de aceleración	0,2-30 kV

Presión máxima de vacío	10e-5 Torr
Corriente de sonda	2-40 nA
Magnificación	x10-300k
Resolución	3,5 nm a 30 kV

8.1.9. FESEM



Ilustración 67. Columna de FESEM.

Nombre del equipo	FESEM
Resolución	1 nm a 15 kV
	1,7 nm a 1 kV
	4 nm a 0,1 kV

Magnificación	x12-900k
Estabilidad del emisor	0,2%/h
Voltaje de aceleración	0,1-30 kV
Corriente de sonda	4 pA - 10 nA
Cámara	330 nm (ϕ) x 720 nm (h)
Resolución de imagen	3072 x 2304 px
Filtrado de tensión de red	0 a 1500 V

8.1.10 Equipo de ensayo mecánico (electromecánica)



Ilustración 68. Equipo de ensayo mecánico (electromecánico).

Nombre del equipo	Equipo de ensayo mecánico
Marca y modelo	Microtest SCM3000 95
Fuerza máxima	±15 N
Precisión desplazamiento	1 micra
Precisión cél. carga	1 mN
Accionamiento	Electromecánico

8.1.11. Equipo de ensayo a fatiga (hidráulica)



Ilustración 69. Equipo de ensayo a fatiga (hidráulica).

Nombre del equipo	Equipo de ensayo a fatiga
Marca y modelo	Microtest SCM4000 98
Fuerza máxima	±2-3 kN (limit SW, 10 kN)
	±400-500 N (limit SW, 2 kN)
Desplazamiento máximo	±50 mm
Precisión desplazamiento	10 micras
Precisión cél. carga	0,01 N
Accionamiento	Servo-hidráulico

8.1.12. FTIR



Ilustración 70. Equipo de FTIR.

Nombre del equipo	FTIR
Marca y modelo	Alpha Platinum ATR
Peso	7 kg
Dimensiones (ancho x largo)	22 x 30 cm
Rango espectral	8000-10 cm ⁻¹
Altura máxima de trabajo	20 mm
Fuente de luz	Diodo laser dual
Detector	Room temperature DLATGS

8.1.13. TGA



Il·lustració 71. Equipo de TGA.

Nombre del equipo	TGA/DSC
Marca	METTLER TOLEDO
Rango de Temperatura	Temperatura ambiente (RT) hasta 1873 K
Precisión de temperatura	±0,3 K
Tiempo de calentamiento	10 min (RT hasta 1873 K)
Tiempo de enfriamiento	27 min (RT hasta 1873 K)
Tiempo de enfriamiento con hielo	13 min (1373 a 373)
Velocidad de calentamiento	100 K/min
Velocidad de enfriamiento	-20 K/min (>473 K)
Volumen de muestra	<900 µL

8.2. Scripts y funciones empleadas en el análisis de datos

8.2.1. Función *emodulus.m*

Esta función fue empleada para el cálculo de los módulos elásticos aparentes, para las 5 réplicas de un tipo concreto de muestra (*string* necesario como input de la función).

```
function [ M ] = emodulus( hoja )
%hoja debe ser un string de caracteres en el que se especifique la hoja
%del excel a leer, y con ello, el tipo de muestra

%Lectura de los vectores de tension y deformacion
[tens_def_1]=xlsread('CVM mecs.xlsx',hoja,'E:F');
[tens_def_2]=xlsread('CVM mecs.xlsx',hoja,'K:L');
[tens_def_3]=xlsread('CVM mecs.xlsx',hoja,'Q:R');
[tens_def_4]=xlsread('CVM mecs.xlsx',hoja,'W:X');
[tens_def_5]=xlsread('CVM mecs.xlsx',hoja,'AC:AD');
```

```

LNG=zeros(1,5); M=zeros(1,5);
LNG(1,1)=size(tens_def_1,1);
LNG(1,2)=size(tens_def_2,1);
LNG(1,3)=size(tens_def_3,1);
LNG(1,4)=size(tens_def_4,1);
LNG(1,5)=size(tens_def_5,1);

%Se halla la recta de regresion
%Se calcula en el rango entre el 10% y el 50% de los datos
m=polyfit(tens_def_1(round(LNG(1,1)/10):round(LNG(1,1)/2),1),tens_def_1(round(LNG(1,1)/10):round(
LNG(1,1)/2),2),1);

%Se evalua la tension ajustada a la recta de regresion, y su error respecto
%a la tension experimental
error=abs(tens_def_1(:,2)-(m(1).*tens_def_1(:,1)+m(2)));
umbral=0.01; %umbral de error para la seleccion de datos

%seleccion de datos
lab=find(error<=umbral);

%Hallar la nueva recta de regresion
m=polyfit(tens_def_1(lab,1),tens_def_1(lab,2),1); %M(1)=Módulo elástico aparente
M(1,1)=m(1);

%Se repite para el resto de réplicas
%replica 2
m=polyfit(tens_def_2(round(LNG(1,2)/10):round(LNG(1,2)/2),1),tens_def_2(round(LNG(1,2)/10):round(
LNG(1,2)/2),2),1);
error=abs(tens_def_2(:,2)-(m(1).*tens_def_2(:,1)+m(2)));
lab=find(error<=umbral);
m=polyfit(tens_def_2(lab,1),tens_def_2(lab,2),1);
M(1,2)=m(1);

%replica 3
m=polyfit(tens_def_3(round(LNG(1,3)/10):round(LNG(1,3)/2),1),tens_def_3(round(LNG(1,3)/10):round(
LNG(1,3)/2),2),1);
error=abs(tens_def_3(:,2)-(m(1).*tens_def_3(:,1)+m(2)));
lab=find(error<=umbral);
m=polyfit(tens_def_3(lab,1),tens_def_3(lab,2),1);
M(1,3)=m(1);

%replica 4
m=polyfit(tens_def_4(round(LNG(1,4)/10):round(LNG(1,4)/2),1),tens_def_4(round(LNG(1,4)/10):round(
LNG(1,4)/2),2),1);
error=abs(tens_def_4(:,2)-(m(1).*tens_def_4(:,1)+m(2)));
lab=find(error<=umbral);
m=polyfit(tens_def_4(lab,1),tens_def_4(lab,2),1);
M(1,4)=m(1);

%replica 5
m=polyfit(tens_def_5(round(LNG(1,5)/10):round(LNG(1,5)/2),1),tens_def_5(round(LNG(1,5)/10):round(
LNG(1,5)/2),2),1);
error=abs(tens_def_5(:,2)-(m(1).*tens_def_5(:,1)+m(2)));
lab=find(error<=umbral);
m=polyfit(tens_def_5(lab,1),tens_def_5(lab,2),1);
M(1,5)=m(1);
end

```

8.2.2. Script AllE modulus.m

Este breve *script* se utilizó para llevar a cabo los cálculos por parte de la función *emodulus.m*, a todos los tipos de muestras, y generar un gráfico estadístico *box and whiskers*, desde el que visualizar la distribución de los módulos elásticos aparentes:

```
E=zeros(4,5);
E(1,:) = emodulus( 'C' );
E(2,:) = emodulus( '1' );
E(3,:) = emodulus( '2' );
E(4,:) = emodulus( '3' );
boxplot(E,{'Control' '0.1% GO' '0.2% GO' '0.5% GO'})
xlabel('Grupos de muestras')
ylabel('Módulo Elástico Aparente (MPa)')
```

8.2.3. Función F_mec_parameters_v6.m

Esta función se empleó para el cálculo de los módulos de elasticidad y límite del *plateau* de las curvas de tensión-deformación completas, así como su representación.

```
function [ E_bulk, e_limit ] =F_mec_parameters_v6( muestra )
```

Lectura de los archivos

```
if (muestra=='C')
    muestra='E:F';
end
if (muestra=='1')
    muestra='K:L';
end
if (muestra=='2')
    muestra='Q:R';
end
if (muestra=='3')
    muestra='W:X';
end
[tens_def_Cr1]=xlsread('CVM Mec_s_full.xlsx','r1',muestra);
[tens_def_Cr2]=xlsread('CVM Mec_s_full.xlsx','r2',muestra);
[tens_def_Cr3]=xlsread('CVM Mec_s_full.xlsx','r3',muestra);
[tens_def_Cr4]=xlsread('CVM Mec_s_full.xlsx','r4',muestra);
[tens_def_Cr5]=xlsread('CVM Mec_s_full.xlsx','r5',muestra);
```

Filtrado señal

```
fcs=0.02; % ajuste manual, restrictivo para evaluar la 2da derivada
[b,a]=butter(2,fcs); %definimos el tipo de filtro, 2do grado
lowdif_tens_Cr1=diff(filter(b,a,tens_def_Cr1)); % aplicamos el filtro al conjunto de datos y
hallamos su derivada
```



```
lowdif_tens_Cr2=diff(filter(b,a,tens_def_Cr2));
lowdif_tens_Cr3=diff(filter(b,a,tens_def_Cr3));
lowdif_tens_Cr4=diff(filter(b,a,tens_def_Cr4));
lowdif_tens_Cr5=diff(filter(b,a,tens_def_Cr5));
```

Selección de los primeros conjuntos de datos

```
x1=15; x2=55; % porcentajes de datos, definen el rango para data1
data1_Cr1=(round(x1*length(lowdif_tens_Cr1(:,1))/100):round(x2*length(lowdif_tens_Cr1(:,1))/100))
;
data1_Cr2=(round(x1*length(lowdif_tens_Cr2(:,1))/100):round(x2*length(lowdif_tens_Cr2(:,1))/100))
;
data1_Cr3=(round(x1*length(lowdif_tens_Cr3(:,1))/100):round(x2*length(lowdif_tens_Cr3(:,1))/100))
;
data1_Cr4=(round(x1*length(lowdif_tens_Cr4(:,1))/100):round(x2*length(lowdif_tens_Cr4(:,1))/100))
;
data1_Cr5=(round(x1*length(lowdif_tens_Cr5(:,1))/100):round(x2*length(lowdif_tens_Cr5(:,1))/100))
;

x3=90; % ajuste manual, porcentaje a partir del cual seleccionar data2

maxm=max(lowdif_tens_Cr1(:,2));
data2_Cr1=find(lowdif_tens_Cr1(:,2)>(maxm*x3/100));
maxm=max(lowdif_tens_Cr2(:,2));
data2_Cr2=find(lowdif_tens_Cr2(:,2)>(maxm*x3/100));
maxm=max(lowdif_tens_Cr3(:,2));
data2_Cr3=find(lowdif_tens_Cr3(:,2)>(maxm*x3/100));
maxm=max(lowdif_tens_Cr4(:,2));
data2_Cr4=find(lowdif_tens_Cr4(:,2)>(maxm*x3/100));
maxm=max(lowdif_tens_Cr5(:,2));
data2_Cr5=find(lowdif_tens_Cr5(:,2)>(maxm*x3/100));
```

Regresión lineal 1

se obtiene la regresión con respecto a los datos originales, almacenados en la variable tens

```
P2_Cr1=polyfit(tens_def_Cr1(data2_Cr1,1), tens_def_Cr1(data2_Cr1,2), 1); % regresión lineal data2
P2_Cr2=polyfit(tens_def_Cr2(data2_Cr2,1), tens_def_Cr2(data2_Cr2,2), 1);
P2_Cr3=polyfit(tens_def_Cr3(data2_Cr3,1), tens_def_Cr3(data2_Cr3,2), 1);
P2_Cr4=polyfit(tens_def_Cr4(data2_Cr4,1), tens_def_Cr4(data2_Cr4,2), 1);
P2_Cr5=polyfit(tens_def_Cr5(data2_Cr5,1), tens_def_Cr5(data2_Cr5,2), 1);
```

Reselección de data2 y segunda regresión lineal

```
umbral=2;
error=abs(tens_def_Cr1(:,2)-(tens_def_Cr1(:,1)*P2_Cr1(1)+P2_Cr1(2)));
data2_Cr1=find(error<umbral);
error=abs(tens_def_Cr2(:,2)-(tens_def_Cr2(:,1)*P2_Cr2(1)+P2_Cr2(2)));
data2_Cr2=find(error<umbral);
error=abs(tens_def_Cr3(:,2)-(tens_def_Cr3(:,1)*P2_Cr3(1)+P2_Cr3(2)));
data2_Cr3=find(error<umbral);
error=abs(tens_def_Cr4(:,2)-(tens_def_Cr4(:,1)*P2_Cr4(1)+P2_Cr4(2)));
data2_Cr4=find(error<umbral);
error=abs(tens_def_Cr5(:,2)-(tens_def_Cr5(:,1)*P2_Cr5(1)+P2_Cr5(2)));
data2_Cr5=find(error<umbral);

P2_Cr1=polyfit(tens_def_Cr1(data2_Cr1,1), tens_def_Cr1(data2_Cr1,2), 1); % regresión lineal data2
P2_Cr2=polyfit(tens_def_Cr2(data2_Cr2,1), tens_def_Cr2(data2_Cr2,2), 1);
P2_Cr3=polyfit(tens_def_Cr3(data2_Cr3,1), tens_def_Cr3(data2_Cr3,2), 1);
```

```
P2_Cr4=polyfit(tens_def_Cr4(data2_Cr4,1), tens_def_Cr4(data2_Cr4,2), 1);
P2_Cr5=polyfit(tens_def_Cr5(data2_Cr5,1), tens_def_Cr5(data2_Cr5,2), 1);
```

Reseleccion de data1

```
umbral_def=0.4/1000; % ajuste manual
lowdif2_tens=diff(lowdif_tens_Cr1); % al solo emplearse para calculos, se recicla
lowdif2_tens=filter(b,a,lowdif2_tens); % idem/ se suaviza la señal de segunda derivada para
evitar falsos minimos
minm=min(lowdif2_tens(:,2));
if (max(find(lowdif2_tens(:,2)<minm+umbral_def))>=max(data1_Cr1)) % para el rechazo de falsos
minimos
    data1_Cr1=find(lowdif2_tens(:,2)<minm+umbral_def);
end

lowdif2_tens=diff(lowdif_tens_Cr2);
lowdif2_tens=filter(b,a,lowdif2_tens);
minm=min(lowdif2_tens(:,2));
if (max(find(lowdif2_tens(:,2)<minm+umbral_def))>=max(data1_Cr2))
    data1_Cr2=find(lowdif2_tens(:,2)<minm+umbral_def);
end

lowdif2_tens=diff(lowdif_tens_Cr3);
lowdif2_tens=filter(b,a,lowdif2_tens);
minm=min(lowdif2_tens(:,2));
if (max(find(lowdif2_tens(:,2)<minm+umbral_def))>=max(data1_Cr3))
    data1_Cr3=find(lowdif2_tens(:,2)<minm+umbral_def);
end

lowdif2_tens=diff(lowdif_tens_Cr4);
lowdif2_tens=filter(b,a,lowdif2_tens);
minm=min(lowdif2_tens(:,2));
if (max(find(lowdif2_tens(:,2)<minm+umbral_def))>=max(data1_Cr4))
    data1_Cr4=find(lowdif2_tens(:,2)<minm+umbral_def);
end

lowdif2_tens=diff(lowdif_tens_Cr5);
lowdif2_tens=filter(b,a,lowdif2_tens);
minm=min(lowdif2_tens(:,2));
if (max(find(lowdif2_tens(:,2)<minm+umbral_def))>=max(data1_Cr5))
    data1_Cr5=find(lowdif2_tens(:,2)<minm+umbral_def);
end
```

Cálculo de parámetros

```
% modulo elastico del material macizo
E_bulk(1)=P2_Cr1(1); E_bulk(2)=P2_Cr2(1); E_bulk(3)=P2_Cr3(1); E_bulk(4)=P2_Cr4(1);
E_bulk(5)=P2_Cr5(1);

% limite de deformacion plastica, fin del plateau
e_limit(1)=max(data1_Cr1);
e_limit(2)=max(data1_Cr2);
e_limit(3)=max(data1_Cr3);
e_limit(4)=max(data1_Cr4);
e_limit(5)=max(data1_Cr5);
```

Representación de resultados

```
% Representacion conjunta
hold on
```

```

plot(tens_def_Cr1(:,1),tens_def_Cr1(:,2))
plot(tens_def_Cr1(e_limit(1),1), tens_def_Cr1(e_limit(1),2),'o');

plot(tens_def_Cr2(:,1),tens_def_Cr2(:,2))
plot(tens_def_Cr2(e_limit(2),1), tens_def_Cr2(e_limit(2),2),'o');

plot(tens_def_Cr3(:,1),tens_def_Cr3(:,2))
plot(tens_def_Cr3(e_limit(3),1), tens_def_Cr3(e_limit(3),2),'o');

plot(tens_def_Cr4(:,1),tens_def_Cr4(:,2))
plot(tens_def_Cr4(e_limit(4),1), tens_def_Cr4(e_limit(4),2),'o');

plot(tens_def_Cr5(:,1),tens_def_Cr5(:,2))
plot(tens_def_Cr5(e_limit(5),1), tens_def_Cr5(e_limit(5),2),'o');

hold off

% limite de deformacion plastica, fin del plateau
e_limit(1)=tens_def_Cr1(e_limit(1),1);
e_limit(2)=tens_def_Cr1(e_limit(2),1);
e_limit(3)=tens_def_Cr1(e_limit(3),1);
e_limit(4)=tens_def_Cr1(e_limit(4),1);
e_limit(5)=tens_def_Cr1(e_limit(5),1);

end

```

8.2.4. Script *AllMec_param.m*

De forma equivalente a *AllE modulus.m*, el siguiente *script* se usó para extender los cálculos a todos los tipos de muestras, y su representación en un diagrama *box and whiskers*.

```

[E(1,:),e_lim(1,:)] = F_mec_parameters_v6('C');
[E(2,:),e_lim(2,:)] = F_mec_parameters_v6('1');
[E(3,:),e_lim(3,:)] = F_mec_parameters_v6('2');
[E(4,:),e_lim(4,:)] = F_mec_parameters_v6('3');

boxplot(E,{'Control' '0.1% GO' '0.2% GO' '0.5% GO'})
xlabel('Grupos de muestras')
ylabel('Módulo Elástico(MPa)')

boxplot(e_lim,{'Control' '0.1% GO' '0.2% GO' '0.5% GO'})
xlabel('Grupos de muestras')
ylabel('Límite del plateau/deformación plástica')

```

8.2.5. Script *meause_in_image.m*

El presente *script* se elaboró para el cálculo de la dimensión de dos tipos de poros, en una imagen concreta y localizada en el mismo directorio que el *script*.

```

I=imread('3T_1000.a.tif'); % se lee la imagen y se transforma en b&w
hold on
imshow(I)
dim_ref=input(2); % se toman los puntos que delimitan la linea de referencia
markedI=insertMarker(I, dim_ref,'o','size',3,'color','green');
lng_ref=sqrt(((dim_ref(1,1)-dim_ref(2,1))^2) + ((dim_ref(1,2)-dim_ref(2,2))^2)); % se calcula la
metrica entre los 2 puntos
% equivalente a 60 micras en la imagen
imshow(markedI); % muestra los puntos seleccionados

dim_calc=input(2); % se toman los puntos que delimitan la dimensión a medir
markedI=insertMarker(markedI, dim_calc,'s','size',5,'color','red');
lng_calc=sqrt(((dim_calc(1,1)-dim_calc(2,1))^2) + ((dim_calc(1,2)-dim_calc(2,2))^2));
imshow(markedI);

if (lng_ref>0)
    lng_norm1=60*(lng_calc/lng_ref)
else
    printf('Error en la toma de la referencia. Vuelva a intentarlo')
end

dim_calc=input(2); % se toman los puntos que delimitan la dimensión a medir
markedI=insertMarker(markedI, dim_calc,'s','size',5,'color','yellow');
lng_calc=sqrt(((dim_calc(1,1)-dim_calc(2,1))^2) + ((dim_calc(1,2)-dim_calc(2,2))^2));
imshow(markedI);

if (lng_ref>0)
    lng_norm2=60*(lng_calc/lng_ref)
else
    printf('Error en la toma de la referencia. Vuelva a intentarlo')
end

```

8.2.6. Función picos_lambda.m

La función *picos_lambda.m* localiza las longitudes de onda a la que se encuentran los picos reales de las curvas de FTIR (almacenados sus valores en ficheros .txt), así como calcula los valores normalizados de los picos.

El esquema del funcionamiento del algoritmo es el siguiente:

- Se establece el lambda central de cada pico, conocido por la literatura científica, y un ancho de banda por el que buscar en nuestros datos
- Se encuentra el rango de longitudes de onda en torno al pico central
- Se localiza el máximo del conjunto y se obtiene su posición en el vector de longitudes de onda
- Se actualiza el valor del pico central al valor máximo real, dentro del rango evaluado
- Se extiende dicho proceso para todos los picos detectables en la curva de FITR
- Se almacenan todas las longitudes de onda de los picos, y sus valores normalizados respecto al máximo (usualmente el pico a 1725 cm⁻¹)

```
function [ lambda_peaks ] = picos_lambda( char )
```

```
% char es una cadena de caracteres en la que aparece el nombre del fichero  
% a leer
```

Leemos el fichero char y localizamos lambda_1725, PCL esther

```
id=fopen(char,'r');  
[fID_C_0,ndata]=fscanf(id,'%f'); % calculamos el numero de datos  
id=fopen(char,'r'); % actualizamos el id del fichero para repetir una lectura  
fID_C_0=fscanf(id,'%f',[2,ndata/2]); % actualizamos los valores de fID, reordenándolos en el  
formato [2, ndata/2]  
  
% fID_C_0 posee en su fila 1 los valores de longitud de onda,  
% y en su fila 2 los valores de absorbancia  
  
BW=40; %por ejemplo, ajustar, siempre par por comodidad  
lambda=1725; %lambda central, estimación del pico a encontrar  
band=find((fID_C_0(1,:)>(lambda-BW/2))&(fID_C_0(1,:)<(lambda+BW/2))); %localizar el rango de  
valores lambda  
peak=max(fID_C_0(2,band)); % hallar el pico  
lambda1725_id=find(fID_C_0(2,:)==peak);  
lambda1725=fID_C_0(1,lambda1725_id); % localizar la longitud de onda a la que se encuentra el  
máximo  
  
% Las variables lambda, band y peak se iran reciclando en el codigo
```

Localizamos lambda_2945, PCL alcalo

```
lambda=2945;  
band=find((fID_C_0(1,:)>(lambda-BW/2))&(fID_C_0(1,:)<(lambda+BW/2)));  
peak=max(fID_C_0(2,band));  
lambda2945_id=find(fID_C_0(2,:)==peak);  
lambda2945=fID_C_0(1,lambda2945_id);
```

Localizamos lambda_2865, PCL alcalo

```
lambda=2865;  
band=find((fID_C_0(1,:)>(lambda-BW/2))&(fID_C_0(1,:)<(lambda+BW/2)));  
peak=max(fID_C_0(2,band));  
lambda2865_id=find(fID_C_0(2,:)==peak);  
lambda2865=fID_C_0(1,lambda2865_id);
```

Localizamos lambda_3551, GO hidroxyl

```
% lambda=3551;  
% band=find((fID_C_0(1,:)>(lambda-BW/2))&(fID_C_0(1,:)<(lambda+BW/2)));  
% peak=max(fID_C_0(2,band));  
% lambda3551_id=find(fID_C_0(2,:)==peak);  
% lambda3551=fID_C_0(1,lambda3551_id);
```

Localizamos lambda_1630, GO C=C

```
lambda=1630;
band=find((fID_C_0(1,:) > (lambda-BW/2)) & (fID_C_0(1,:) < (lambda+BW/2)));
peak=max(fID_C_0(2,band));
lambda1630_id=find(fID_C_0(2,:)==peak);
lambda1630=fID_C_0(1,lambda1630_id);
```

Localizamos lambda_1718, GO C=O carboxyl

```
lambda=1718;
band=find((fID_C_0(1,:) > (lambda-BW/2)) & (fID_C_0(1,:) < (lambda+BW/2)));
peak=max(fID_C_0(2,band));
lambda1718_id=find(fID_C_0(2,:)==peak);
lambda1718=fID_C_0(1,lambda1718_id);
```

Localizamos lambda_1312, GO C-O carboxyl

```
lambda=1312;
band=find((fID_C_0(1,:) > (lambda-BW/2)) & (fID_C_0(1,:) < (lambda+BW/2)));
peak=max(fID_C_0(2,band));
lambda1312_id=find(fID_C_0(2,:)==peak);
lambda1312=fID_C_0(1,lambda1312_id);
```

Localizamos lambda_1152, GO C-O epoxy

```
lambda=1152;
band=find((fID_C_0(1,:) > (lambda-BW/2)) & (fID_C_0(1,:) < (lambda+BW/2)));
peak=max(fID_C_0(2,band));
lambda1152_id=find(fID_C_0(2,:)==peak);
lambda1152=fID_C_0(1,lambda1152_id);
```

Localizamos lambda_1026, GO C-O alkoxy

```
lambda=1026;
band=find((fID_C_0(1,:) > (lambda-BW/2)) & (fID_C_0(1,:) < (lambda+BW/2)));
peak=max(fID_C_0(2,band));
lambda1026_id=find(fID_C_0(2,:)==peak);
lambda1026=fID_C_0(1,lambda1026_id);
```

Organizamos los valores de lambda obtenidos

```
lambda_peaks(1,:)=[lambda2945, lambda2865, lambda1725, lambda1718, lambda1630, lambda1312,
lambda1152, lambda1026];
lambda_peaks(2,:)=[fID_C_0(2,lambda2945_id), fID_C_0(2,lambda2865_id), fID_C_0(2,lambda1725_id),
fID_C_0(2,lambda1718_id), fID_C_0(2,lambda1630_id), fID_C_0(2,lambda1312_id),
fID_C_0(2,lambda1152_id), fID_C_0(2,lambda1026_id)];
lambda_peaks(2,:)=lambda_peaks(2,:)/max(lambda_peaks(2,:));
```

end

8.2.7. Función picos_lambdaHAp_version.m

La función *picos_lambdaHAp_version.m* se trata de una modificación de la primera versión, para el tratamiento de las muestras de FTIR con contenido en HAp. El problema de su procesamiento, para un mismo ancho de banda de análisis, es que es posible la detección de varios picos para un mismo pico central. Por ello, se elaboró un apartado de rechazo de falsos picos, en función de la proximidad al pico teórico (el pico de menor distancia al pico teórico será considerado como auténtico). Su implementación es la siguiente:

```
function [ lambda_peaks ] = picos_lambda_HApv( char )  
% char es una cadena de caracteres en la que aparece el nombre del fichero  
% a leer
```

Leemos el fichero char y localizamos lambda_1725, PCL esther

```
id=fopen(char,'r');  
[fID_C_0,ndata]=fscanf(id,'%f'); % Calculamos el numero de datos  
id=fopen(char,'r'); % actualizamos el id del fichero para repetir una lectura  
fID_C_0=fscanf(id,'%f',[2,ndata/2]); % actualizamos los valores de fID, reordenándolos en el  
formato [2, ndata/2]  
  
% fID_C_0 posee en su fila 1 los valores de longitud de onda,  
% y en su fila 2 los valores de absorbancia  
  
error=0.01;  
BW=40; %por ejemplo, ajustar, siempre par por comodidad  
lambda=1725; %lambda central, estimación del pico a encontrar  
band=find((fID_C_0(1,:)>(lambda-BW/2))&(fID_C_0(1,:)<(lambda+BW/2))); %localizar el rango de  
valores lambda  
peak=max(fID_C_0(2,band)); % hallar el pico  
lambda1725_id=find(fID_C_0(2,:)==peak);  
lambda1725=fID_C_0(1,lambda1725_id); % localizar la longitud de onda a la que se encuentra el  
máximo  
if (size(lambda1725_id)==1)  
  
else  
    peak=min(abs(lambda1725-lambda)); % se reutiliza la variable peak para hallar la minima  
diferencia en lambda respecto la referencia  
    peak=find(abs(fID_C_0(1,lambda1725_id)-lambda)<peak+error); % ahora peak es el indice del  
punto que presenta menor dif respecto a la lambda de referencia  
    lambda1725_id=lambda1725_id(peak);  
end  
lambda1725=fID_C_0(1,lambda1725_id);  
  
% Las variables lambda, band y peak se iran reciclando en el codigo
```

Localizamos lambda_2945, PCL alcalo

```
lambda=2945;  
band=find((fID_C_0(1,:)>(lambda-BW/2))&(fID_C_0(1,:)<(lambda+BW/2)));  
peak=max(fID_C_0(2,band));  
lambda2945_id=find(fID_C_0(2,:)==peak);
```

```

lambda2945=fID_C_0(1,lambda2945_id);
if (size(lambda2945_id)==1)

else
    peak=min(abs(lambda2945-lambda)); % se reutiliza la variable peak para hallar la minima
diferencia en lambda respecto la referencia
    peak=find(abs(fID_C_0(1,lambda2945_id)-lambda)<peak+error); % ahora peak es el indice del
punto que presenta menor dif respecto a la lambda de referencia
    lambda2945_id=lambda2945_id(peak);
end
lambda2945=fID_C_0(1,lambda2945_id);

```

Localizamos lambda_2865, PCL alcalo

```

lambda=2865;
band=find((fID_C_0(1,:)>(lambda-Bw/2))&(fID_C_0(1,:)<(lambda+Bw/2)));
peak=max(fID_C_0(2,band));
lambda2865_id=find(fID_C_0(2,)==peak);
lambda2865=fID_C_0(1,lambda2865_id);
if (size(lambda2865_id)==1)

else
    peak=min(abs(lambda2865-lambda)); % se reutiliza la variable peak para hallar la minima
diferencia en lambda respecto la referencia
    peak=find(abs(fID_C_0(1,lambda2865_id)-lambda)<peak+error); % ahora peak es el indice del
punto que presenta menor dif respecto a la lambda de referencia
    lambda2865_id=lambda2865_id(peak);
end
lambda2865=fID_C_0(1,lambda2865_id);

```

Localizamos lambda_3551, GO hidroxyl

```

% lambda=3551;
% band=find((fID_C_0(1,:)>(lambda-Bw/2))&(fID_C_0(1,:)<(lambda+Bw/2)));
% peak=max(fID_C_0(2,band));
% lambda3551_id=find(fID_C_0(2,)==peak);
% lambda3551=fID_C_0(1,lambda3551_id);

```

Localizamos lambda_1630, GO C=C

```

lambda=1630;
band=find((fID_C_0(1,:)>(lambda-Bw/2))&(fID_C_0(1,:)<(lambda+Bw/2)));
peak=max(fID_C_0(2,band));
lambda1630_id=find(fID_C_0(2,)==peak);
lambda1630=fID_C_0(1,lambda1630_id);
if (size(lambda1630_id)==1)

else
    peak=min(abs(lambda1630-lambda)); % se reutiliza la variable peak para hallar la minima
diferencia en lambda respecto la referencia
    peak=find(abs(fID_C_0(1,lambda1630_id)-lambda)<peak+error); % ahora peak es el indice del
punto que presenta menor dif respecto a la lambda de referencia
    lambda1630_id=lambda1630_id(peak);
end
lambda1630=fID_C_0(1,lambda1630_id);

```

Localizamos lambda_1718, GO C=O carboxyl


```

lambda=1718;
band=find((fID_C_0(1,:)>(lambda-Bw/2))&(fID_C_0(1,:)<(lambda+Bw/2)));
peak=max(fID_C_0(2,band));
lambda1718_id=find(fID_C_0(2,)==peak);
lambda1718=fID_C_0(1,lambda1718_id);
if (size(lambda1718_id)==1)

else
    peak=min(abs(lambda1718-lambda)); % se reutiliza la variable peak para hallar la minima
diferencia en lambda respecto la referencia
    peak=find(abs(fID_C_0(1,lambda1718_id)-lambda)<peak+error); % ahora peak es el indice del
punto que presenta menor dif respecto a la lambda de referencia
    lambda1718_id=lambda1718_id(peak);
end
lambda1718=fID_C_0(1,lambda1718_id);

```

Localizamos lambda_1312, GO C-O carboxyl

```

lambda=1312;
band=find((fID_C_0(1,:)>(lambda-Bw/2))&(fID_C_0(1,:)<(lambda+Bw/2)));
peak=max(fID_C_0(2,band));
lambda1312_id=find(fID_C_0(2,)==peak);
lambda1312=fID_C_0(1,lambda1312_id);
if (size(lambda1312_id)==1)

else
    peak=min(abs(lambda1312-lambda)); % se reutiliza la variable peak para hallar la minima
diferencia en lambda respecto la referencia
    peak=find(abs(fID_C_0(1,lambda1312_id)-lambda)<peak+error); % ahora peak es el indice del
punto que presenta menor dif respecto a la lambda de referencia
    lambda1312_id=lambda1312_id(peak);
end
lambda1312=fID_C_0(1,lambda1312_id);

```

Localizamos lambda_1152, GO C-O epoxy

```

lambda=1152;
band=find((fID_C_0(1,:)>(lambda-Bw/2))&(fID_C_0(1,:)<(lambda+Bw/2)));
peak=max(fID_C_0(2,band));
lambda1152_id=find(fID_C_0(2,)==peak);
lambda1152=fID_C_0(1,lambda1152_id);
if (size(lambda1152_id)==1)

else
    peak=min(abs(lambda1152-lambda)); % se reutiliza la variable peak para hallar la minima
diferencia en lambda respecto la referencia
    peak=find(abs(fID_C_0(1,lambda1152_id)-lambda)<peak+error); % ahora peak es el indice del
punto que presenta menor dif respecto a la lambda de referencia
    lambda1152_id=lambda1152_id(peak);
end
lambda1152=fID_C_0(1,lambda1152_id);

```

Localizamos lambda_1026, GO C-O alkoxy

```

lambda=1026;
band=find((fID_C_0(1,:)>(lambda-Bw/2))&(fID_C_0(1,:)<(lambda+Bw/2)));
peak=max(fID_C_0(2,band));
lambda1026_id=find(fID_C_0(2,)==peak);
lambda1026=fID_C_0(1,lambda1026_id);

```

```

if (size(lambda1026_id)==1)
else
    peak=min(abs(lambda1026-lambda)); % se reutiliza la variable peak para hallar la minima
    diferencia en lambda respecto la referencia
    peak=find(abs(fID_C_0(1,lambda1026_id)-lambda)<peak+error); % ahora peak es el indice del
    punto que presenta menor dif respecto a la lambda de referencia
    lambda1026_id=lambda1026_id(peak);
end
lambda1026=fID_C_0(1,lambda1026_id);

```

Organizamos los valores de lambda obtenidos

```

lambda_peaks(1,:)=[lambda2945, lambda2865, lambda1725, lambda1718, lambda1630, lambda1312,
lambda1152, lambda1026];
lambda_peaks(2,:)=[fID_C_0(2,lambda2945_id), fID_C_0(2,lambda2865_id), fID_C_0(2,lambda1725_id),
fID_C_0(2,lambda1718_id), fID_C_0(2,lambda1630_id), fID_C_0(2,lambda1312_id),
fID_C_0(2,lambda1152_id), fID_C_0(2,lambda1026_id)];
lambda_peaks(2,:)=lambda_peaks(2,:)./max(lambda_peaks(2,:));
end

```

8.3. Presupuesto

A continuación, se muestra el presupuesto desglosado en sus diferentes componentes, así como el cómputo del presupuesto global del proyecto, y la representación porcentual del coste de cada sección:

Personal implicado en el TFG					
Etiqueta	Cargo	Unidad	Cantidad	Precio unitario (€/ud)	Coste (€)
1	Directa de proyecto	h	10	24	240
2	Técnico de laboratorio	h	5	12	60
3	Estudiante de GIB	h	300	5,625	1687,5
Subtotal					1987,5

Equipos					
Etiqueta	Descripción	Unidad	Cantidad	Precio unitario (€/ud)	Coste

1	Balanza analítica de precisión	h	8	0,20	1,60
2	Pie de rey digital	Nº	1	34,90	34,90
3	Estufa de precisión universal	h	168	0,08	13,44
4	Vitrina de extracción	h	25,5	1,83	46,75
5	Congelador a -20 °C	h	126	0,09	11,55
6	Sonicador de varilla	h	2	1,83	3,67
7	Baño de ultrasonidos	h	1	0,11	0,11
8	Centrífuga 5804R	h	0,5	0,28	0,14
9	Bomba de vacío de aceite	h	1	0,19	0,19
10	Desecador	h	157,67	0,10	15,77
11	SEM	h	2	13,00	26,00
12	FESEM	h	6	25,00	150,00
13	Ensayo a compresión	h	3	2,75	8,25
14	Ensayo a fatiga	h	3	5,50	16,50
15	FTIR	h	1	1,10	1,10
16	TGA	h	16	0,95	15,20
Subtotal					345,16

Materiales					
Material de laboratorio					
Etiqueta	Descripción	Unidad	Cantidad	Precio unitario (€/ud)	Coste

1	Vial de vidrio	Nº	88	0,100	8,80
2	Tubo Falcon	Nº	60	0,345	20,68
3	Cristalizador de teflón	Nº	4	22,000	88,00
4	Vaso de precipitados (100 mL) PYREX	Nº	1	4,407	4,41
5	Vaso de precipitados (1 L) PYREX	Nº	2	11,910	23,82
6	Cuchara de acero inox.	Nº	1	4,950	4,95
7	Frasco ISO PYREX 100 mL	Nº	5	6,098	30,49
8	Bote plástico ISO 500 mL	Nº	4	2,271	9,08
9	Probeta plástico 1 L	Nº	1	16,210	16,21
10	Barra de agitación magnética	Nº	1	1,430	1,43
11	Pipeta Pasteur 3 mL	Caja	1	11,500	11,50
12	Cápsulas de Pt(TGA)	Nº	5	2,850	14,25
13	Plataforma de Al	Nº	1	5,100	5,10
14	Papel secante	Rollo	1	0,050	0,05
15	Parafilm	Rollo	1	38,000	38,00
16	Placa Petri plástico	Nº	4	0,126	0,50
17	Placa Petri vidrio	Nº	1	1,330	1,33
18	Jeringa para insulina	Caja	1	0,468	0,47
19	Troquel biopsias 4mm	Nº	1	1,550	1,55
20	Pinza metálica de tres puntos de anclaje	Nº	1	7,320	7,32

21	Eppendorfs de centrífuga (2 mL)	Nº	30	0,088	2,63
22	Pinzas antideslizantes	Nº	1	15,800	15,80
Subtotal					306,37
Material de Protección Individual					
Etiqueta	Descripción	Unidad	Cantidad	Precio unitario (€/ud)	Coste
1	Máscara de gases tipo V de protección de vías respiratorias	Nº	1	40	40,00
2	Gafas de laboratorio	Nº	1	8	8,00
3	Máscara antipartículas	Nº	1	10	10,00
4	Bata de laboratorio	Nº	1	15	15,00
5	Guantes criogénicos	Nº	1	4,21	4,21
6	Guantes de Nitrilo	Nº	1	8,15	8,15
7	Guantes de Latex	Nº	1	6,25	6,25
Subtotal					91,61
Reactivos					
Etiqueta	Descripción	Unidad	Cantidad	Precio unitario (€/ud)	Coste
1	PCL	g	17,06	0,776	13,24
2	GO	mg	60,72	0,123	7,47
3	Acetona	L	0,50	14,096	7,05
4	N2 líquido	L	3,00	21,934976	65,80

5	Etanol	L	4,00	18,074	72,30
6	Agua milli-Q	L	2,25	0,015073333	0,03
7	Dioxano	mL	92,67	0,0498578	4,62
8	NaCl	g	62,13	0,04463	2,77
9	NaHCO ₃	g	29,76	0,03207	0,95
10	KCl	g	2,32	0,081	0,19
11	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	g	2,32	0,20425	0,47
12	MgCl ₂ ·6H ₂ O	g	3,14	0,19965	0,63
13	HCl	mL	9,50	0,10394	0,99
14	CaCl ₂ ·6H ₂ O	g	5,81	0,021182	0,12
15	Na ₂ SO ₄ ·10H ₂ O	g	1,63	0,20826	0,34
Subtotal					176,98

		Porcentaje (%)
Personal implicado en el TFG	1987,50	68,35
Equipos	345,16	11,87
Materiales de laboratorio	306,37	10,54
Material de protección individual	91,61	3,15
Reactivos	176,98	6,09
Total (€)	2907,62	

Tabla 24. Desglose del presupuesto, cómputo del coste total y coste en porcentajes de cada sección.

Distribución porcentual del coste del proyecto

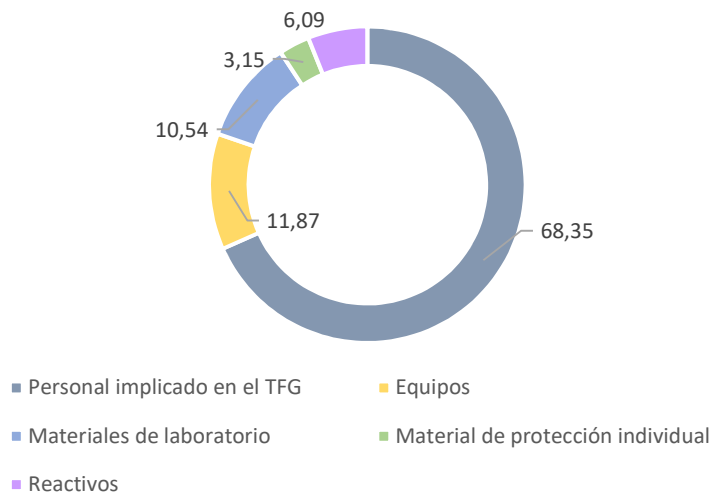


Ilustración 72. Distribución porcentual del coste del proyecto.

9. Bibliografía

- [1]: Apuntes de "1.1 Los materiales en medicina" de la asignatura Biomateriales, 3r curso semestre B, GIB-UPV. Guillermo Vilariño Feltrer, curso 2016-2017.
- [2]: Lee K, Chan CK, Patil N, Goodman SB. "Cell therapy for bone regeneration--bench to bedside". J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009; 10.1002/jbm.b.31199
- [3]: Apuntes de "Biomecánica de la fractura ósea" de la asignatura Biomecánica, 3r curso semestre A, GIB-UPV, curso 2016-2017
- [4]: T. Albrektsson. "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration". Eur Spine J. 2001;10.1007/s005860100282.
- [5]: J. Rodenas, A. Vidaurre. "Effects of hydroxyapatite filler on long-term hydrolytic degradation of PLLA/PCL porous scaffolds". Polymer Degradation and Stability. 2015; 10.1016/j.polymdegradstab.2015.04.015
- [6]: Apuntes de "Graphene photonics and electronics" de la asignatura Biotecnología y nanotecnología, 3r curso semestre B, GIB UPV. Javier Martí Sendra, curso 2016-2017
- [7]: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-graphene-oxide-with-functional-groups-A-Epoxy-bridges-B-hydroxy_fig13_292671318
- [8]: M. Gruselle. "Apatites: A new family of catalysts in organic synthesis". Journal of Organometallic Chemistry. 2015; 10.1016/j.jorganchem.2015.01.018
- [9]: https://www.researchgate.net/publication/284904111_The_hydroxyapatite_crystal_A_closer_look
- [10]: Apuntes de "Cerámicas bioabsorbibles y reactivas" de la asignatura Biomateriales, 3r curso semestre B, GIB-UPV. Vicente Amigó Borrás, curso 2016-2017
- [11]: <http://www.posterus.sk/?p=4244>
- [12]: Apuntes de "Caracterización de nanomateriales y nanoestructuras" de la asignatura Biotecnología y nanotecnología, 3r curso semestre B, GIB UPV. Alejandro José Martínez Abietar, curso 2016-2017
- [13]: <https://kids.britannica.com/students/assembly/view/167800>
- [14]: <https://nptel.ac.in/courses/102103044/module3/lec17/3.html>
- [15]: <http://www.upv.es/entidades/SME/info/859071normalc.html>
- [16]: A. W. Coats, J. P. Redfern. "Thermogravimetric analysis. A review". Analyst (J). 1963.
- [17]: Kokubo T, Takadama H. "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?". Biomaterials. 2006; 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017

[18]: Bohner M, Lemaître J. "Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?". *Biomaterials*. 2009; 10.1016/j.biomaterials.2009.01.008

[19]: J. Song et al. "The preparation and characterization of polycaprolactone/graphene oxide biocomposite nanofiber scaffolds and their application for directing cell behaviors". *Carbon (J)*. 2015; 10.1016/j.carbon.2015.09.011

[20]: I. Castilla-Cortázar, A. Vidaurre, B. Marí, A.J. Campillo-Fernández. "Morphology, crystallinity, and molecular weight of Poly (ϵ -caprolactone)/Graphene oxide composites". *SPE Polymer Composites*. 2019