



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

***Sistemas combinados de ácido
hialurónico y polímeros acrílicos
como biomateriales para
ingeniería tisular***

Tesis Doctoral

SERGIY IVASHCHENKO

Directores: Manuel Monleón Pradas
Dunia Mercedes García Cruz

Septiembre 2017

RESUMEN

El ácido hialurónico, HA, y el poli(acrilato de etilo), PEA, son dos polímeros ampliamente utilizados en aplicaciones biomédicas, especialmente en la ingeniería tisular, debido a sus excelentes propiedades biocompatibles y bioactivas. El HA es un biopolímero altamente hidrofílico y el PEA, por lo contrario, es hidrofóbico. Además, cada uno por separado tiene ciertas deficiencias que limitan el potencial de su aplicación, por lo que el poder combinarlos de forma viable en un biomaterial resulta de gran interés y a su vez es un reto muy prometedor y atractivo para el desarrollo de nuevos biomateriales.

En esta tesis se desarrollaron varios sistemas combinados HA-PEA consiguiendo compatibilizar las dos fases en estado no entrecruzado, empleando el ácido fórmico, FA, como solvente común. Previamente, se investigó el efecto del ácido fórmico sobre los polímeros a utilizar, para detectar posibles modificaciones químicas, degradación o aparición de citotoxicidad. Los resultados obtenidos mediante técnicas de caracterización físico-química y biológica de los HA y PEA tratados con FA demostraron que el FA no altera la estructura química de los dos polímeros ni genera citotoxicidad en ellos. Por lo tanto, se procedió a la fabricación de sistemas combinados de HA-bl-PEA, desarrollados con diferentes geometrías y arquitecturas, en forma de films bidimensionales, membranas hiladas y andamiajes (*scaffolds*) porosos tridimensionales, utilizando las técnicas de evaporación de solvente (*solvent casting*), electrohilado (*electrospinning*) y extracción en frío (*freeze-extraction*). Las propiedades físico-químicas revelan un cierto refuerzo mutuo producido por ambas fases, y la caracterización biológica confirma el potencial del sistema como biomaterial.

Para aumentar la estabilidad de sistemas combinados y el grado de compatibilidad entre HA y PEA, se decidió emplear, en vez de homopolímero PEA, un copolímero a base de acrilato de etilo, EA, y otro monómero acrílico que sea más reactivo y presente grupos funcionalizables (hidroxilo o carboxilo). Con este fin, se desarrollaron sistemas copoliméricos P(EA-co-CEA), tanto entrecruzados como no entrecruzados, con diferente contenido de 2-carboxi acrilato de etilo, CEA. Siendo materiales novedosos, ellos fueron sometidos a una caracterización completa físico-química y biológica, que confirmó su aptitud como biomateriales. Al final, se estudió la posibilidad de producción a base de ellos de sistemas combinados con el ácido hialurónico que poseerían las propiedades mejores que las ya conseguidas en los sistemas HA-PEA.

SUMMARY

Hyaluronic acid, HA, and poly (ethyl acrylate), PEA, are two polymers widely used in biomedical applications, especially in tissue engineering, because of their excellent biocompatible and bioactive properties. HA is a highly hydrophilic biopolymer and the PEA, on the other hand, is hydrophobic. In addition, each one of them has certain shortcomings that limit the potential of its application, so that being able to combine them in a viable way in one biomaterial is of great interest and in turn is a very promising and attractive challenge for the development of new biomaterials.

In this thesis, using formic acid, FA, as the common solvent, HA-PEA combined systems were developed, making both polymeric phases compatible in their non-crosslinked state. Previously, the effect of formic acid on HA and PEA was evaluated, and no possible chemical modifications, significant degradation nor cytotoxicity appearance were detected by means of techniques of physical-chemical and biological characterization. Thus, various HA-bl-PEA combined systems with different composition, geometry and architecture were manufactured as two-dimensional films, electrospun membranes and three-dimensional porous scaffolds, using solvent casting, electrospinning and freeze-extraction techniques. The physical-chemical properties of fabricated systems reveal a certain mutual reinforcement produced by both phases, and the biological characterization highlights the potential of the studied systems as biomaterials.

In order to increase the degree of compatibility between HA and PEA and the overall stability of combined systems, it was decided to use, instead of homopolymer PEA, a copolymer based on ethyl acrylate, EA, and another acrylic monomer which should be more reactive and have functionalizable chemical groups (hydroxyl or carboxyl). For this purpose, both cross-linked and non-crosslinked P(EA-co-CEA) copolymer systems with different content of 2-carboxy ethyl acrylate, CEA, were developed. Being novel materials, they were subjected to a complete physical-chemical and biological characterization, confirming their aptitude as biomaterials. Subsequently, was studied the possibility of producing combined systems based on these copolymers and hyaluronic acid, which would possess better properties than those already achieved in HA-PEA systems.

RESUM

L'àcid hialurònic, HA, i el poli(acrilat d'etil), PEA, són dos polímers amplament utilitzats en aplicacions biomèdiques, especialment en l'enginyeria tissular, per les seues excel·lents propietats biocompatibles i bioactives. L'HA és un biopolímer altament hidrofílic i el PEA, pel contrari, és hidrofòbic. A més, cada un per separat té certes deficiències que limiten el potencial de la seua aplicació, de manera que poder combinar-los de manera viable en un biomaterial resulta de gran interès i al seu torn és un repte molt prometedor i atractiu per al desenvolupament de nous biomaterials.

En aquesta tesi es van desenvolupar diversos sistemes combinats HA-PEA aconseguint compatibilitzar les dues fases en estat no entrecreuat, emprant l'àcid fòrmic, FA, com a solvent comú. Prèviament, es va investigar l'efecte de l'àcid fòrmic sobre els polímers a utilitzar, per descartar possibles modificacions químiques, degradació o aparició de citotoxicitat. Els resultats obtinguts mitjançant tècniques de caracterització fisicoquímica i biològica dels HA i PEA tractats amb FA van demostrar que el FA no altera l'estructura química dels dos polímers ni genera citotoxicitat en ells. Es va procedir a la fabricació de sistemes combinats de HA-PEA, desenvolupats amb diferents geometries i arquitectures, en forma de *films* bidimensionals, de membranes electrofilades, i de bastides (*scaffolds*) porosos tridimensionals, utilitzant les tècniques d'evaporació de solvent (*solvent casting*), electrofilatura (*electrospinning*) i extracció en fred (*freeze-extraction*). Les propietats fisicoquímiques revelen un cert reforç mutu produït per les dues fases, i la caracterització biològica confirma el potencial del sistema com a biomaterial.

Per augmentar l'estabilitat dels sistemes combinats i el grau de compatibilitat entre HA i PEA es va decidir emprar, en comptes de l'homopolímer PEA, un copolímer a base d'acrilat d'etil, EA, i un altre monòmer acrílic que fos més reactiu i presentés grups funcionalitzables (hidroxil o carboxil). Amb aquesta finalitat, es van desenvolupar sistemes copolimèrics P(EA-co-CEA), tant entrecreuats com no entrecreuats, amb diferent contingut de 2-carboxi acrilat d'etil, CEA. Sent materials nous, ells van ser sotmesos a una caracterització completa fisicoquímica i biològica, que va confirmar la seua aptitud com a biomaterials. Al final, es va estudiar la possibilitat de producció a base d'ells de sistemes combinats amb l'àcid hialurònic, que posseïrien millors propietats que les ja aconseguides en els sistemes HA-PEA.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT) de la UPV, donde permanezco de manera ininterrumpida desarrollando mi actividad investigadora desde el año 2009, dando como frutos mi Trabajo Fin de Carrera, el Trabajo Fin de Máster y ahora la presente Tesis Doctoral. Sobre todo, agradezco a mis directores, **Dr. Manuel Monleón Pradas** y **Dra. Dunia Mercedes García Cruz**, por todo el tiempo y el esfuerzo dedicado durante el desarrollo de este trabajo y por ayudarme a resolver los numerosos problemas conceptuales y metodológicos que ocurrieron durante su curso. La idea de Dunia de probar el ácido fórmico como disolvente común para HA y PEA fue el fundamento sobre el cual yo iba desarrollando el trabajo, pudiendo compatibilizar ambos polímeros en un mismo sistema y así desarrollar biomateriales con diferentes arquitecturas y geometrías. La idea de Manolo de intentar copolimerizar el EA con otro co-monómero reactivo con el fin de aumentar su compatibilidad con el HA dio lugar a la producción y caracterización de los sistemas copoliméricos P(EA-co-CEA). En relación con este último estudio, mis agradecimientos particulares a **Ana Jesús Molina García** por ayudarme a desarrollarlo, en el marco de su Proyecto Fin de Carrera, bajo la dirección general de Manuel Monleón Pradas y Ana Vallés Lluch. Ser tutor de Ana Jesús para su PFC fue una gran experiencia para mí, siendo igual de productiva que agradable. ¡Te deseo un buen futuro profesional en el campo de Ingeniería Química, querida Ana Jesús! Igualmente, doy mis sinceras gracias a la **Dra. Ana Vallés Lluch**, por su dedicación y tiempo contestando numerosas preguntas mías y dándome consejos y sugerencias muy útiles durante todos los años del doctorado.

Asimismo, quiero destacar un papel importante de la **Dra. Cristina Martínez Ramos** en el desarrollo de mi tesis, especialmente por su ayuda con los ensayos biológicos. Dado que soy biotecnólogo de origen, pero muy desviado y atrapado por el campo de materiales (en concreto, síntesis y caracterización de polímeros), Cristina me ayudó a recordar y reforzar las buenas prácticas de laboratorio de cultivos celulares, aplicando además cuando era necesario su irreplicable capacidad de activar y motivar para alcanzar el rendimiento necesario.

Por otro lado, quiero mencionar y agradecer a mis primeros directores en el CBIT, **Dra. Gloria Gallego Ferrer** y **Dr. Jorge Luis Escobar Ivirico**, así como al **Dr. José Luis Gómez Ribelles**, por abrirme las puertas en el mundo de los biomateriales. A la **Dra. Laura Teruel Biosca**, por

su papel esencial en el correcto funcionamiento de los laboratorios del CBIT y por su ayuda cotidiana en numerosos ensayos. Y, en general, a todo el equipo del CBIT, tanto a los doctores, profesores universitarios, como a los doctorandos y estudiantes de proyectos fin de grado, por colaborar juntos en creación de un buen ambiente de trabajo y amistad que se destaca en el CBIT. Sin discriminar a nadie, me gustaría agradecer especialmente a **Edu, Manu, Guillermo**, otra **Laura, María, Sara, Paloma, Sergio**, otro **Guillermo, Ximo, Panadero** y a muchos, muchos más. Aparte, agradezco al Servicio de Microscopía de la UPV por la calidad del servicio prestado durante estos años.

También cabe destacar que el desarrollo del presente proyecto de investigación, tanto en asuntos de abastecimiento de material, como en la contratación del propio doctorando ha sido posible gracias a la financiación obtenida a través de los proyectos **MAT2011-28791-C03-02** "Materiales de soporte y liberación controlada para la regeneración de estructuras neurales afectadas por ictus" y **MAT2015-66666-C3-1-R** "Biohíbridos para la promoción del crecimiento axonal y la regeneración en el sistema nervioso central y periférico" del Ministerio de Economía y Competitividad.

Y un agradecimiento especial a mi **madre**. ¡Gracias, mamá, por todo tu apoyo y tu ayuda durante los años de doctorado, y especialmente en un período tan intenso y difícil como fue la redacción de esta Tesis!

INDICE

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y ESTADO DEL ARTE..... | 13 |
| 1.1. INGENIERÍA TISULAR Y BIOMATERIALES POLIMÉRICOS. | 14 |
| 1.2. POLIACRILATO DE ETILO Y OTROS POLÍMEROS ACRÍLICOS BIOCOMPATIBLES | 21 |
| 1.3. ÁCIDO HIALURÓNICO | 25 |
| 1.4. TÉCNICAS DE COMBINACIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO CON LOS POLÍMEROS ACRÍLICOS..... | 29 |
| 1.5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO | 31 |
| CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 35 |
| 2.1. MATERIALES | 36 |
| 2.1.1. Reactivos de síntesis | 36 |
| 2.1.2. Disolventes | 38 |
| 2.1.3. Ensayos de Citotoxicidad y Cultivos celulares | 39 |
| 2.2. FABRICACIÓN DE SISTEMAS COMBINADOS..... | 41 |
| 2.2.1. Polimerización de acrilatos | 41 |
| 2.2.2. Preparación de mezclas HA-PEA | 43 |
| 2.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS SISTEMAS PRODUCIDOS | 45 |
| 2.3.1. Espectrometría Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR)..... | 46 |
| 2.3.2. Ensayo termogravimétrico (TGA) | 46 |
| 2.3.3. Determinación del volumen específico..... | 48 |
| 2.3.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) | 48 |
| 2.3.5. Análisis dinamo-térmico-mecánico (DMTA) | 50 |
| 2.3.6. Pruebas de hinchamiento/solubilidad..... | 50 |
| 2.3.7. Medición del ángulo de contacto..... | 51 |
| 2.3.8. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) | 52 |
| 2.4. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA IN VITRO | 53 |
| 2.4.1. Ensayos de citotoxicidad in vitro con extractos de materiales..... | 53 |
| 2.4.2. Estudio de viabilidad y proliferación celular | 56 |
| CAPÍTULO 3. ÁCIDO FÓRMICO COMO DISOLVENTE COMÚN PARA EL ÁCIDO HIALURÓNICO Y EL POLIACRILATO DE ETILO | 59 |
| 3.1. INTRODUCCIÓN | 60 |
| 3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 63 |
| 3.3. CONCLUSIONES PARCIALES..... | 71 |

| | |
|--|-----|
| CAPÍTULO 4. SISTEMAS COMBINADOS HA-PEA | 73 |
| 4.1. INTRODUCCIÓN | 74 |
| 4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 75 |
| 4.2.1. Preparación y caracterización de los films HA-PEA mediante la técnica de solvent casting | 75 |
| 4.2.2. Producción y caracterización de las membranas hiladas de HA-PEA vía electrospinning | 87 |
| 4.2.3. Producción de los scaffolds tridimensionales de HA-PEA vía freeze-extraction | 94 |
| 4.2.4. Producción de redes poliméricas semi-interpenetradas (semi-IPNs) de HA-PEA mediante hibridación acoplada al hinchamiento | 96 |
| 4.3. CONCLUSIONES PARCIALES | 97 |
| CAPÍTULO 5. SISTEMAS COPOLIMÉRICOS P(EA-co-CEA) | 101 |
| 5.1. INTRODUCCIÓN | 102 |
| 5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 103 |
| 5.2.1. Síntesis de sistemas poliméricos | 103 |
| 5.2.2. Caracterización físico-química de los materiales producidos | 107 |
| 5.2.3. Evaluación de la biocompatibilidad de los sistemas producidos | 137 |
| 5.3. CONCLUSIONES PARCIALES | 141 |
| CAPÍTULO 6. SISTEMAS COMBINADOS HA-P(EA-co-CEA) | 145 |
| 6.1. INTRODUCCIÓN | 146 |
| 6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 147 |
| 6.2.1. Producción de los films HA-P(EA-co-CEA) mediante la técnica de solvent casting | 147 |
| 6.2.2. Caracterización físico-química de los films producidos | 148 |
| 6.3. CONCLUSIONES PARCIALES | 155 |
| CAPÍTULO 7. CONSIDERACIONES FINALES | 157 |
| 7.1. CONCLUSIONES GENERALES | 158 |
| 7.2. TRABAJO FUTURO Y PERSPECTIVAS | 159 |
| BIBLIOGRAFÍA | 163 |
| LISTA DE FIGURAS | 173 |
| LISTA DE TABLAS | 177 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 179 |

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y ESTADO DEL ARTE

1.1. INGENIERÍA TISULAR Y BIOMATERIALES POLIMÉRICOS.

La Ingeniería Tisular ('Tissue Engineering', **TE**) es una disciplina relativamente nueva y emergente que está dirigida hacia la reparación de tejidos y órganos y es un constituyente importante de la medicina regenerativa, junto con la terapia celular y la biotecnología. Todas estas técnicas están estrechamente relacionadas: por ejemplo, la **terapia celular** se basa en la utilización de células madre para tratar diferentes patologías, por su parte la TE provee a las células con un vehículo/soporte adecuado (biomaterial) para una buena adhesión y proliferación celular, intentando simular las condiciones óptimas para cada aplicación en particular. A la vez, la TE también está estrechamente ligada a la **biotecnología**, siendo esta última una disciplina dirigida para aprovechar de los diferentes procesos biológicos que tienen lugar a nivel molecular, celular y más allá, con fines benéficos para la sociedad y la naturaleza.

Según la definición fundamental de Langer y Vacanti, la **Ingeniería Tisular** es un campo que “aplica los principios de la biología y de la ingeniería para el desarrollo de sustitutos funcionales con el fin de reparar o reemplazar un tejido dañado” [1,2]. Eso determina que la TE interpreta al organismo vivo como una compleja maquinaria fisicoquímica intentando reproducir sus partes o desarrollar sustitutos de ellas y proponer una solución suficiente ante una herida, lesión u cualquier otro tipo de desequilibrio, para que el organismo pueda reponerse rápidamente del daño. El intenso desarrollo de la TE fue impulsado por los avances tecnológicos de las últimas décadas y por la constante exploración de las posibilidades de corregir lesiones, enfermedades y malformaciones congénitas, pretendiendo restaurar, mantener o mejorar la función tisular [3,4].

La Ingeniería Tisular tiene un amplio carácter interdisciplinar, ya que repercute tanto en las ciencias de la salud, como en la ciencia de los materiales, la física, la química, la termodinámica, etc. La TE explota los recursos de la ingeniería biomédica, biología celular y bioquímica pretendiendo desarrollar células funcionales y sustitutos de los órganos/tejidos para repararlos, restaurar su estructura y reemplazar su función biológica perdida debido a anomalías congénitas, lesiones, enfermedades o envejecimiento. Hoy en día, se puede regenerar, en principio, cualquier estructura biológica a nivel de órgano o tejido, incluyendo hueso, dentina, cartílago, piel, tejido muscular, células y válvulas cardíacas infartadas, glándulas, compartimentos oculares, tráquea,

esófago y hasta tejidos de regiones tan sensibles o delicadas, como el sistema nervioso central y/o periférico [4].

La función normal de un órgano o tejido en el cuerpo está regulada por la actividad de sus células, interacciones células - matriz extracelular (ECM), señalización molecular y otros estímulos (químicos, mecánicos, eléctricos). Por lo tanto, las estrategias de la Ingeniería Tisular consisten en combinar biomateriales, células, moléculas biológicamente activas y estímulos específicos para cada caso, tejido u órgano concreto. La finalidad de esta técnica no es sustituir de manera pasiva la estructura dañada o deficiente, sino facilitar, dirigir y guiar los procesos regenerativos, usando para ello un biomaterial que sirve de soporte/andamiaje provisional para que las células cargadas en él o procedentes de los tejidos adyacentes vayan sustituyéndolo de manera transitoria con su ECM y proporcionando las condiciones apropiadas para la restauración del tejido [5,6]. En otras palabras, un buen biomaterial debe permitir a las células hacer su parte del trabajo y organizarse en un tejido funcional mientras el biomaterial se está degradando [7].

Los **biomateriales** se han definido como sustancias distintas de drogas o alimentos, que se emplean en el diagnóstico y la terapia de los tejidos, órganos y funciones biológicas. Hoy en día el empleo de biomateriales y sus combinaciones con células y/o moléculas terapéuticas (biohíbridos) puede ayudar a suministrar el soporte, prestar las condiciones y señales necesarias para asegurar la regeneración guiada de prácticamente cualquier tejido/órgano diana. Los biomateriales deben satisfacer ciertos requisitos específicos que varían en función del tejido diana y ambiente de aplicación, aunque se puede señalar algunos criterios generales que debe reunir cualquier biomaterial para ser aplicado en la TE [7].

Primero, cualquier biomaterial debe ser compatible y no perjudicar los tejidos y fluidos biológicos con los que van a interactuar: debe ser capaz de integrarse en su lugar diana sin producir daños destructivos, o causar cualquier respuesta celular adversa, como reacciones citotóxicas, alérgicas, inflamación aguda u otra mínima respuesta inmune en el ambiente fisiológico de su aplicación, ni tampoco originar los productos citotóxicos durante su degradación *in vivo*, abasteciendo así una buena viabilidad celular. Esta característica esencial que deben poseer todos biomateriales se denomina **biocompatibilidad** [8].

Otro concepto muy relacionado, **bioactividad**, se basa en las características intrínsecas de las interacciones células-material, y se manifiesta en como el material afecta al comportamiento de las células

implicadas en términos de la adhesión, proliferación, migración, diferenciación celular y mantenimiento del fenotipo, haciendo posible el desarrollo correcto de las células específicas y mantenimiento de sus respectivas funciones. La bioactividad, entre otro, asegura que el biomaterial implantado no va a ser inmediatamente atacado o encapsulado por el sitio receptor y podrá funcionar sin causar cualquier daño a tejidos adyacentes y órganos, así como al organismo entero. Por esto, en cada caso particular, la buena integración del material depende tanto de sus características particulares, derivadas de su composición química, consistencia mecánica (hidrogeles vs. andamios rígidos), permeabilidad, grado de polaridad, propiedades hidrófilas/hidrófobas, etc., como de las del tejido receptor (órgano diana) [8].

Particularmente, el grado de hidrofiliidad/hidrofobicidad de un biomaterial determina la adsorción de las proteínas en su superficie, lo cual directamente condiciona su integración *in vivo*. Esta propiedad viene determinada básicamente por los grupos funcionales presentes en las moléculas del material. Los grupos funcionales biológicamente importantes que determinan su carácter polar y las propiedades más hidrófilas son los hidroxilos (–OH), los carbonilos (C=O) y su unión, los carboxilos (–COOH), los aminos (–NH₃), y el carácter no polar, los metilos (–CH₃) [9,10]. El carácter hidrófobo facilita la adhesión celular, pero la hidrofiliidad facilita la hidratación e hinchado del material en un ambiente acuoso, favoreciendo el aporte de agua y nutrientes *in vivo* [11]. Además, las propiedades hidrófilas potencian la biodegradabilidad del material al acelerar la hidrólisis de las cadenas poliméricas en condiciones de pH fisiológico, lo que es muy importante en caso de tejidos blandos [11]. Un biomaterial adecuado debe poseer una combinación adecuada del carácter hidrófobo e hidrófilo para cada aplicación en particular.

Asimismo, el carácter de la difusión de agua, nutrientes, colonización y crecimiento celular en el material también vienen determinadas por su **arquitectura** (por ejemplo, grado de porosidad) y **propiedades superficiales** [12]. Un biomaterial debe facilitar su colonización por las células, por lo que su **morfología**, **microtextura** o simplemente grado de rugosidad pueden afectar significativamente al comportamiento celular [13]. El **tamaño** y la **estructura** también son aspectos muy importantes debido a la necesidad de minimizar la invasión quirúrgica y posibles lesiones en el órgano diana. En general, los mejores resultados suelen mostrar las estructuras con alta relación superficie/volumen: **scaffolds macroporosos** con estructura de poros interconectados, **membranas hiladas**, **microesferas**, **nanofibras**, **microcanales**, etc.) [14–16]. Al final, el diseño y

las propiedades de los biomateriales deben adaptarse a los requisitos particulares del sitio de su implantación y, siempre que sea posible, debe cumplirse su reproducibilidad de lote a lote.

Un tipo muy extendido de biomateriales poliméricos son los soportes tridimensionales (andamios, **scaffolds**) que se desarrollan con el objetivo de imitar, reproduciendo a medida de lo posible, la estructura y las condiciones de la ECM de un tejido/órgano diana [17]. Son sustratos idóneos para ser colonizados por las células, ya que suelen alojarlas bien en un contexto tridimensional, promoviendo su adhesión y/o atrapamiento, y además facilitan el transporte de nutrientes y la vascularización, muy necesarios para los procesos regenerativos, y también hacen posible la formación *in situ* de los hidrogeles en su interior [18]. Por eso, el uso de los **scaffolds** en la TE abarca una amplia gama de aplicaciones *in vivo*, incluyendo dianas tan diferentes, como hueso, cartílago, ojo, sistema nervioso, etc. [19].

Actualmente, se emplean **biomateriales poliméricos**, cerámicos, metálicos y compuestos (composites). Además, los biomateriales pueden ser de origen **natural** o **sintéticos**, y manifestar *in vivo* un carácter biodegradable o bioestable. Los materiales **biodegradables** tienen una gran ventaja frente a los **bioestables**, ya que proporcionan un soporte provisional hasta que las células serán capaces de secretar su propia ECM, y con el avance de su degradación se sustituyen gradualmente por el tejido regenerador, al final desapareciendo por completo sin dejar algún residuo extraño en su sitio de aplicación. Eso significa que la superficie del material es continuamente renovada, de esta forma proporcionando un sustrato dinámico para el componente celular, pero a la vez requiere que la velocidad de la degradación del material y la del crecimiento celular estén muy ajustadas [6]. El carácter de la degradación del material polimérico viene determinado por muchos factores, entre los cuales se puede destacar: tipos de enlace en la cadena principal y grupos funcionales presentes en las cadenas laterales del polímero, su peso molecular, grado de hidrofiliidad y cristalinidad, entre otros factores. Por ejemplo, los enlaces éster son degradados lentamente, mientras que un incremento de la hidrofiliidad aumenta su susceptibilidad ante la hidrólisis. También es de importancia vital que la descomposición del polímero no origine productos citotóxicos [20]. No obstante, en cualquier caso, la integridad mecánica de los biomateriales debe mantenerse durante todo el proceso regenerativo.

Los **polímeros naturales** más comúnmente empleados en la TE según su carácter son polisacáridos (agarosa, alginato, ácido hialurónico, quitosano, metilcelulosa) o polipéptidos (colágeno, gelatina, seda, péptidos auto-ensamblados, SAPs) [21–23]. Según su procedencia, se destacan los que forman parte de la ECM de animales (colágeno y ácido hialurónico) [22,23], los derivados de algas (agarosa y alginato) [24,25], proteínas derivados de plasma sanguíneo (fibrina y fibronectina) [26,27] etc. Los polímeros naturales se utilizan en la TE para fabricar fibras, recubrimientos, o scaffolds tridimensionales a su base [1].

La gran ventaja de su empleo en TE se basa en que los polímeros naturales o están directamente presentes en los tejidos, por lo que sus efectos ya están bien conocidos, o tienen similitudes con las sustancias presentes en los tejidos. Por lo tanto, los andamios diseñados a base de polímeros naturales poseen en general una mayor biocompatibilidad con su tejido huésped. En cuanto a tejidos blandos, los polímeros naturales se destacan por su capacidad de formar *in situ* los hidrogeles que permiten minimizar las cirugías invasivas, reduciendo el volumen de la lesión, y facilitar su implantación e integración, con una buena respuesta celular [14,28–32]. Además, en algunos casos, ellos pueden transferir señales a las células mejorando las interacciones célula-sustrato y ajustando a medida el comportamiento celular. También, por lo general los polímeros naturales son biodegradables por degradación enzimática, sin originar productos tóxicos durante se degradación *in vivo*. Por otro lado, estos polímeros muy a menudo manifiestan poca consistencia y propiedades mecánicas deficientes.

Sin embargo, los **polímeros sintéticos**, como biomateriales, también presentan algunas ventajas frente a los naturales, incluyendo menores costos, facilidad de modificar, ajustando a medida, sus propiedades mecánicas y físico-químicas, alta manejabilidad y manipulabilidad, entre otras. La mayoría de los polímeros sintéticos permiten diseñar una amplia gama de biomateriales. Entre los polímeros sintéticos más comúnmente utilizados en la TE, se encuentran los tanto los biodegradables, por ejemplo, los poliésteres alifáticos (PLLA, PLGA, PCL, etc.), como los bioestables, por ejemplo los poli(metacrilatos): poli(metacrilato de hidroxietilo), PHEMA, y poli(metacrilato de hidroxipropilo), PHPMA [33–42]. Igualmente, están en auge los policarbonatos y nanocomposites reforzados con nanotubos de carbono (CNTs) o silicio [43–45]. El empleo de poliésteres alifáticos es sugestivo debido a que algunos de ellos están aprobados por la FDA para muchas aplicaciones médicas, llegando a utilizar estos materiales para regeneración de dianas tan sensibles, como el cerebro [46], donde

mostraron buena biocompatibilidad, correcta respuesta celular y reducción significativa de los daños secundarios.

Los polímeros pueden ser clasificados en dos tipos, según su estado de reticulación (entrecruzamiento), cada uno con sus ventajas e inconvenientes para aplicaciones concretas en el ámbito de TE [47]. Los polímeros **no entrecruzados (no reticulados)** consisten de las cadenas separadas, lineales o ramificadas, cuya movilidad molecular no es restringida por enlaces covalentes entre diferentes cadenas. Por esto, ellos tienen mayor flexibilidad, son solubles en sus apropiados disolventes, manifiestan menor estabilidad térmica y mecánica, mayor velocidad de degradación, etc. La gran ventaja de los polímeros no entrecruzados consiste en que pueden ser empleados en técnicas donde es necesario la disolución completa del material, como *solvent casting* y *electrospinning*, que permiten obtener *films* y membranas hiladas (de nano-/microfibras) poliméricos a partir de sus disoluciones. Sin embargo, el carácter no entrecruzado puede complicar el lavado y otros tratamientos de laboratorio, causarles cierta pérdida de integridad del polímero.

En los polímeros **entrecruzados (reticulados)** las cadenas están unidas entre si, formando una red, con los nudos y la distancia entre ellos reflejando la densidad del entrecruzamiento. Por esto, esos polímeros son insolubles en los disolventes, pero pueden alcanzar distinto grado de hinchamiento en ellos, en función de su naturaleza y composición. Debido a que la movilidad de sus cadenas está limitada, ellos poseen mayor estabilidad térmica y mecánica, son más rígidos, menos reactivos, más resistentes contra distintos factores físicos y químicos, y suelen ser bioestables o tener vida útil más larga por ser su degradación mucho más difícil. Además, se exhiben más manejables en cuanto a diferentes tratamientos de laboratorio, por ejemplo, pudiendo ser lavados a ebullición sin perder su integridad, etc.

Tanto unos polímeros, como otros, pueden ser **homopolímeros**, formados por el único tipo de unidad repetitiva que proviene de solo un monómero, o **copolímeros**, que contienen más de un tipo de unidad repetitiva, cada uno derivado de su respectivo co-monómero. Los copolímeros suelen combinar las propiedades de sus componentes, mostrando un comportamiento más o menos intermedio, en función de su contenido. La capacidad de producir diferentes copolímeros, variando el tipo y la proporción de los co-monómeros utilizados, es una herramienta muy robusta para producir biomateriales con unas propiedades deseadas para cada aplicación concreta en el ámbito de Ingeniería Tisular.

1.2. POLIACRILATO DE ETILO Y OTROS POLÍMEROS ACRÍLICOS BIOCOMPATIBLES

Los poliacrilatos son una gran familia de polímeros sintéticos que se obtienen vía adición a partir de los monómeros acrílicos, los ésteres que contienen grupos vinílicos ($-C=C-$) directamente enlazados al carbono del carbonilo [48]. Debido a su manejo fácil y a su rápida polimerización, muchos polímeros acrílicos se emplean extensamente como cementos óseos en la odontología y cirugía ortopédica. El poli(metacrilato de metilo), PMMA, se aplica en el anclaje de la prótesis al hueso contiguo en el reemplazo total de la articulación de rodilla o de cadera, las operaciones más comunes en cirugía ortopédica [49]. Otro ejemplo muy llamativo ha sido el empleo de un híbrido orgánico/inorgánico del copolímero P(EMA-co-HEA), reforzado con sílice, en la mimetización de la estructura con poros tubulares de la dentina natural [50]. Sin embargo, a diferencia de polimetacrilatos, otros poliacrilatos son mucho más elásticos ya que sus cadenas son mucho menos rígidas debido a la ausencia de los grupos metilo en carbonos alternos de la cadena principal, por lo que suelen emplearse en las aplicaciones que requieran flexibilidad y extensibilidad, siendo buenos candidatos para los tejidos blandos [51].

El **poli(acrilato de etilo), PEA**, cuya estructura química se muestra en la Figura 1, se obtiene en una reacción de polimerización radical del monómero de acrilato de etilo (EA), que es un el etil éster del ácido acrílico, y puede reticularse si se añaden pequeñas cantidades de otros comonómeros de acrilato tri- o tetravalentes, típicamente dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA). Sus propiedades físicas vienen determinadas por la flexibilidad de su cadena principal, por su naturaleza polar y por la longitud corta de las cadenas laterales, y están bien estudiadas desde hace mucho tiempo, tanto para forma no entrecruzada, como para la entrecruzada [48].

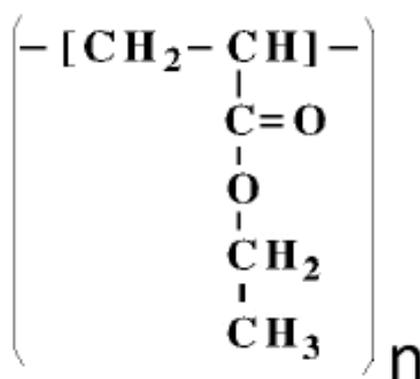


Figura 1. Estructura química del PEA.

PEA es un polímero elastomérico y amorfo, con una temperatura de transición vítrea entre -10 y -20°C, en función de su estado lineal simple o reticulado. En cualquier caso, a temperatura fisiológica ($\approx 37^\circ\text{C}$) PEA se encuentra en un estado de goma (*'rubber state'*), con las propiedades mecánicas similares a las de tejidos blandos. En general, PEA ha mostrado una excelente biocompatibilidad con diferentes tipos de células *in vitro*: condrocitos [52], queratinocitos [53], células endoteliales [54], células neurales [55–62], osteoblastos [63], células madre de pulpa dental [58], así como células madre derivadas del tejido adiposo [64–66]. Además, el PEA se ha propuesto como una plataforma para mantenimiento y crecimiento de las células madre embrionarias humanas [67]. También PEA ha exhibido un excelente rendimiento *in vivo* [50,68], en particular, en el cerebro de ratas [59,60,62] y en el miocardio infartado de ovejas [65]. Muy probablemente, que este excelente comportamiento está relacionado con las conformaciones que las proteínas de ECM, como laminina y fibronectina, adquieren tras su adsorción en la superficie de los andamiajes de PEA, ya que el comportamiento de las células en contacto con los materiales sintéticos viene condicionado por la forma en la que los receptores de membrana celular se unen a los dominios específicos de las proteínas de ECM adsorbidas sobre estos materiales. Igualmente, PEA ha demostrado inducir la fibrillogénesis temprana de la laminina y la fibronectina en su superficie [63,69,70], lo que facilita la adsorción posterior de las estructuras de ECM y su reconocimiento por las células. Esta bioactividad de las superficies de PEA está relacionada con las características propias de su estructura molecular: la polaridad y movilidad de su cadena lateral, y su carácter predominantemente hidrófobo, que evita la estructuración de moléculas de agua en la interfase material-proteínas, facilitando así la interacción directa entre las moléculas del polímero y los dominios de proteína. Sin embargo, el carácter autoadhesivo de homopolímero PEA complica su manejabilidad y manipulabilidad en el laboratorio.

Debido a la facilidad de su polimerización, el PEA puede ser utilizada para producir los *scaffolds* ultraporosos fácilmente colonizables por las células y destinados a servir de andamiajes para su crecimiento guiado [50,53,54,56,57,59–62,64–66,68,71–74]. En función de las diferentes técnicas de lixiviación de porógeno, se pueden fabricar las arquitecturas isotrópicas de poros esféricos interconectadas [64–66,71], disposiciones ortotrópicas de canales cilíndricos que se interconectan ortogonalmente [59,60,72,74–76], o disposición paralela de poros cilíndricos [50,61,64,68].

Por otro lado, son muy prometedoras las aplicaciones de copolímeros a base de PEA. Por ejemplo, el P(EA-co-HEA), su copolímero con un monómero hidrófilo de hidroxiacrilato de etilo (HEA), se utilizó para fabricar los *scaffolds* tan específicos como el anillo de anclaje de una prótesis de córnea, para conseguir un buen crecimiento de las células del estroma de acogida en la estructura porosa del biomaterial y fijación de la lente sintética [71]. Este mismo copolímero mostró un gran éxito en la supervivencia y diferenciación de las células madre neurales sobre un sustrato cubierto por células de la pulpa dental [58].

El **poli(acrilato de carboxietilo), PCEA**, que se muestra en la Figura 2, es un polímero sintético, muy hidrófilo, cuyo monómero es 2-carboxiacrilato de etilo (CEA) [77].

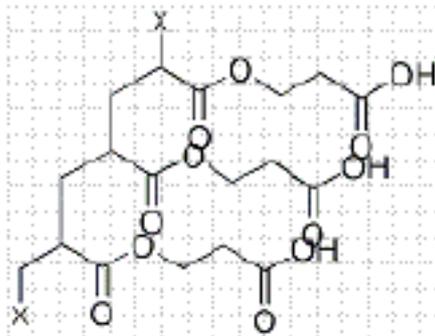


Figura 2. Estructura química del PCEA.

El CEA es un monómero muy miscible y compatible con otros monómeros, por lo que se utiliza frecuentemente como co-monómero para producir copolímeros acrílicos, vinil-acrílicos o estireno-acrílicos, con propiedades adhesivas mejoradas. Es mucho más reactivo en su forma de sal de ácido acrílico en un amplio rango de pH, permitiendo además obtener los copolímeros más uniformes [78]. Por otra parte, debido a la mayor disponibilidad de sus grupos carboxilos ($-\text{COOH}$), el CEA proporciona una adhesión mejorada y estabilidad a los polímeros en emulsión [78]. Este monómero se emplea frecuentemente en la síntesis in situ de hidrogeles a base de quitosano: por ejemplo, uniéndose a los grupos funcionales de la amina primaria del quitosano para posteriormente participar en una reacción de adición de Michael entre los grupos terminales de acrilato y los grupos terminales tiol de polióxido de etileno (PEO) [79]. Existen patentes que describen su empleo, junto con otros monómeros, en producción de materiales biocompatibles [80,81]. Por otra parte, también está descrito su uso como recubrimiento de fibras para los cultivos celulares [82,83]. Otras conocidas aplicaciones biomédicas del CEA son: como componente de la superficie sintética péptido-acrilato para la auto-renovación y

diferenciación de los cardiomiocitos desde células madre embrionarias humanas [84], para imitar la carga negativa y ayudar a prolongar los tiempos de circulación de micropartículas de hidrogel en la sangre [85], como monómero aniónico, en la fabricación de fibras poliméricas [86], como co-monómero en la fabricación de gotas poliméricas [87] y como componente en partículas de impresión [88].

1.3. ÁCIDO HIALURÓNICO

El ácido hialurónico (HA), representado en la Figura 3, es uno de los polímeros naturales más destacados en el organismo de animales vertebrados, siendo un constituyente de la ECM de muchos tejidos como piel, cartílago, hueso, cerebro, músculos, pulmones, riñones e hígado, especialmente abundante en los tejidos conectivos, líquido sinovial y humor hialoide ocular; sin embargo, su contenido en plasma sanguínea es muy bajo [89,90]. Químicamente, el HA es un polisacárido glucosaminoglicano, cuya unidad repetitiva es un disacárido de ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina unidos por enlaces β -1,4 y β -1,3 glicosídicos. Sus cadenas poliméricas son lineales, no ramificadas, y pueden llegar a tamaños grandes, de peso molecular de millones de Daltons.

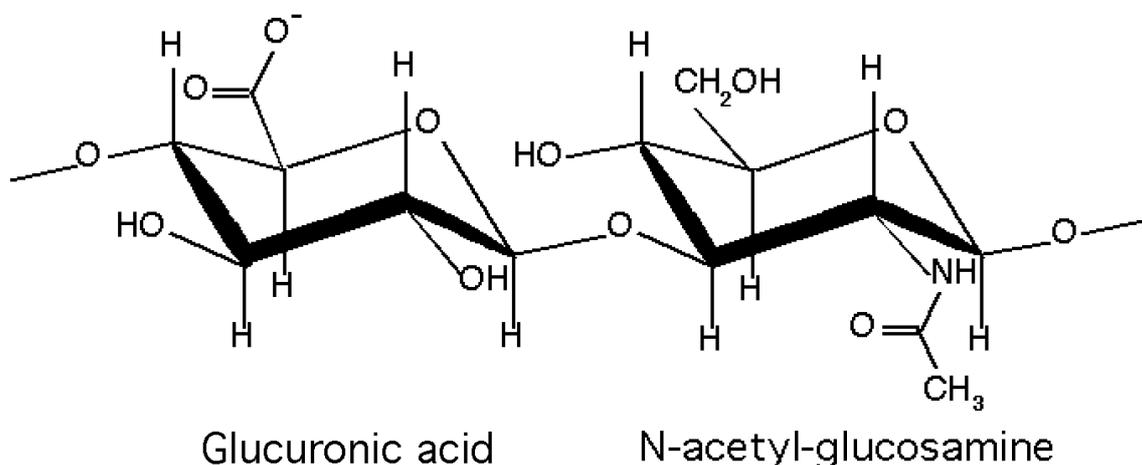


Figura 3. Estructura química del Ácido Hialurónico.

Sus funciones biológicas se extienden desde el desarrollo embrionario, donde HA cumple papel importante en abastecimiento de la migración celular e impedimento de los contactos célula-célula, evitando así posibles respuestas inmune contra las células migrantes. La utilidad del HA para la ingeniería tisular está basada en su involucramiento activo en los procesos regenerativos que, junto con su alta biocompatibilidad, lo convierten en una sustancia prometedor para fabricación de los *scaffolds* a su base para la regeneración de un amplio rango de tejidos blandos, hasta los del sistema nervioso central y periférico [91,92]. Por otro lado, cabe destacar que el carácter muy hidrófilo del ácido hialurónico dificulta la adhesión celular.

El efecto biológico de HA y de los productos de su degradación depende de su peso molecular. Así, las cadenas grandes de HA (que consisten de 1000-5000 unidades repetitivas), suprimen la angiogénesis y

la respuesta inmune local (entre otras cosas, suprimiendo la actividad fagocítica de los macrófagos). Por otro lado, los fragmentos más cortos (desde hexosacáridos hasta cientos de unidades) que se producen durante la degradación de HA o tras lesiones de diverso carácter, en cambio, son factores tróficos para las células endoteliales y promueven la secreción de citocinas, por lo que estimulan la angiogénesis y la respuesta inflamatoria; De esta manera, ellos desempeñan un papel importante de ‘señalizadores de alarma’ frente a diferentes lesiones e infecciones. Por último, los fragmentos más pequeños de ácido hialurónico (tetrasacáridos), habitualmente producidos por las hialuronidasas celulares, estimulan la expresión de proteínas de shock térmico y suprimen la apoptosis, lo que repara el estrés provocado por los efectos de los fragmentos de mayor tamaño.

El uso clínico del HA está aprobado por la FDA para múltiples aplicaciones terapéuticas. Es un biomaterial de uso habitual en medicina estética, oftalmología, reumatología y otología, entre otros campos. Y los ejemplos concretos de sus aplicaciones son: como recubrimiento en heridas cutáneas y úlceras (para promover la curación, proteger frente a agentes dañinos y evitar la desecación), como separador (para evitar adhesiones innecesarias entre órganos y tejidos), como relleno, como lubricante y protector de tejidos blandos durante las intervenciones quirúrgicas, como tratamiento analgésico local en artritis reumatoide, etc. [93,94]. Además, los hidrogeles del HA reticulado también se utilizan ampliamente para la liberación de fármacos [95].

Entre las propiedades del HA se destaca su alta capacidad de hidratación debido a su comportamiento polianiónico a pH fisiológico, en particular, a la ionización masiva de sus grupos carboxilo. Eso atrae y retiene a las moléculas de agua, confiriendo al HA una alta actividad osmótica e importancia en la regulación del homeostasis acuático en muchos tejidos [96,97]. Además, en un medio acuoso sus cadenas son capaces de crear puentes de hidrógeno intermoleculares, originando dos fenómenos trascendentales: (a) aparición de dominios hidrófobos dentro de sus cadenas largas, que facilitan las interacciones HA-HA, HA-proteínas e incluso HA-membrana celular, y (b) estabilización de sus cadenas en estructuras helicoidales, aumentando la viscosidad y haciendo posible la formación de las redes relativamente estables a partir de ciertos pesos moleculares y concentraciones de HA [98–100]. Sin embargo, estas redes pueden ser alteradas por factores mecánicos (por ejemplo, agitación intensa o movimiento), que superen las débiles energías de tal

entrecruzamiento y de estabilización interna de sus cadenas, reduciendo la viscosidad del HA y aumentando sus propiedades elásticas. De allí proviene el papel importante del HA como lubricante en las articulaciones, donde reduce las cargas durante movimientos rápidos, y también en la piel, donde protege a las células frente a la compresión y permite posteriormente recuperar la forma inicial del tejido [89,90].

Por todo esto, el HA en su forma nativa, carece de consistencia, siendo un fluido viscoso y no un sólido capaz de retener las células, y además tiene la estabilidad mecánica, vida útil y manejabilidad insuficientes como para servir de un biomaterial en las aplicaciones de la ingeniería tisular. Para superar dichas limitaciones, el ácido hialurónico debe ser sometido a un entrecruzamiento químico u otra manera de refuerzo, previo a su aplicación *in vivo*, aunque también pudiendo realizarse *in situ* [101–103]. El mencionado entrecruzamiento químico del HA se puede llevar a cabo aprovechando de sus grupos hidroxilo ($-OH$) para crear enlaces de tipo éter ($R-O-R$), o bien aprovechando de sus grupos carboxilo ($-COOH$) para crear enlaces de tipo éster ($R-COO-R$), siendo estos últimos más débiles que los primeros. Las dos opciones son posibles con ayuda de los agentes entrecruzadores, que por su alta reactividad suelen ser sustancias citotóxicas y requieren las condiciones específicas de pH y T° para su funcionamiento correcto: por ejemplo, el DVS, que funciona en medio básico y reticula HA vía éter, el DEO, que funciona en medio ácido y entrecruza HA vía éster, o el Glutaraldehído que funciona en medio ácido y entrecruza HA vía éter [104–106]. Otras posibles estrategias incluyen la modificación química directa del HA, consistiendo en su funcionalización con grupos tiol u otros grupos reactivos [107,108].

1.4. TÉCNICAS DE COMBINACIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO CON LOS POLÍMEROS ACRÍLICOS

La combinación (hibridación) de dos o más materiales, de cara a la aplicación en la TE, es la vía eficaz para combinar sinérgicamente la utilidad particular y las diferentes propiedades (procedentes de diferentes enlaces químicos y grupos funcionales) que aporta cada uno de ellos, o también para compensar las insuficiencias de un material con las excelencias del otro; en otras palabras, se trata de aprovechar de los fenómenos cooperativos o competitivos originados por la combinación en cuestión.

El método más idóneo, desde el punto de vista de la química, es la **copolimerización**, que permite combinar las distintas unidades monoméricas en un copolímero resultante. Sin embargo, para esto las sustancias que se pretende combinar deben permanecer y estar accesibles en su forma monomérica (co-monómeros), aparte de soportar el mismo mecanismo de polimerización y, si se pretende producir un copolímero homogéneo, poseer reactividad y cinética de polimerización similares. A veces, los monómeros inicialmente no son copolimerizables, por lo que necesitan una ligera modificación química (por ejemplo, añadiendo un grupo funcional reactivo a uno de ellos), sin producir alteraciones considerables en sus propiedades.

Como no siempre es posible cumplir tales requisitos, muy a menudo se recurre a otras técnicas. Por ejemplo, partiendo de dos polímeros no reticulados, o uno reticulado y otro no, así como aprovechando la polimerización y/o entrecruzamiento *in situ*, se pueden obtener **redes poliméricas interpenetradas (IPNs)** o **semi-interpenetradas (semi-IPNs)**, de manera simultánea o secuencial, en función del estado inicial de cada componente y el orden cronológico de la producción. En estas redes tridimensionales los polímeros no están unidos químicamente, sino que tienen sus cadenas entrelazadas, siendo la conexión del tipo 'enlace topológico', por lo que no pueden separarse por completo sin romper alguna(s) de las cadenas [109–112]. Sin embargo, eso no excluye la posibilidad de cierta separación de fases y su efecto en las propiedades resultantes de este sistema, ya que las fases no están químicamente unidas a nivel molecular.

Además, otra técnica muy sencilla se basa en el **uso de solventes miscibles**, y consiste en disolver los polímeros a combinar en los disolventes apropiados que son compatibles entre sí, es decir, no producen ninguna precipitación o separación de fases al mezclarlos. Igualmente, puede ser empleado un **solvente común**, si procede. La mezcla producida de esta

manera debe ser homogenizada (por ejemplo, mediante una agitación magnética) y posteriormente sometida al secado con el fin de eliminar los disolventes empleados y dejar el producto combinado en estado seco. Este proceso requiere que los dos polímeros se encuentren en un estado no entrecruzado, pero puede estar acoplado a un entrecruzamiento *in situ* (o posterior de la producción), con el fin de fijar bien las fases e incrementar la estabilidad del sistema.

Cabe destacar que, para el caso particular de combinaciones HA-PEA, hay informes positivos sobre la copolimerización del PEA con el HA modificado químicamente, llevada a cabo por Pérez-Garnes, et al. [113] y, por otro lado, sobre fabricación de las IPNs HA-PEA, reportado por Rodríguez-Perez, et al. [114].

1.5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

La ingeniería tisular tiende a emplear los materiales biodegradables que sustituyen temporalmente la matriz extracelular y proporcionan condiciones óptimas para que las células restauran el tejido en cuestión, con la degradación y desaparición progresiva del propio material. Sin embargo, cuando la calidad del tejido regenerado no es suficiente para asegurar un soporte mecánico adecuado (por ejemplo, en caso de hernias, miocardio, tráquea, etc.), es preferente que el biomaterial empleado tenga un carácter semi-biodegradable y siga confiriendo al tejido un constante refuerzo mecánico, entre otros efectos.

La **hipótesis** en que se basa el presente trabajo de investigación consiste en la posibilidad de desarrollar los sistemas combinados semi-degradables, a base del ácido hialurónico como parte biodegradable, por un lado, y un polímero acrílico (en principio, PEA) como parte bioestable. De tal manera, su combinación deberá permitir explotar la sinergia de estos dos materiales diferentes, manteniendo y combinando sus excelentes propiedades biológicas (descritas en los apartados 1.2 y 1.3) y además dotar al HA de un refuerzo adicional por parte del componente bioestable, PEA.

El **objetivo general**, de acuerdo con la hipótesis formulada, consiste en encontrar los solventes compatibles o un solvente común para combinar HA con PEA, y conseguir un producto estable y manejable, sin que se alteren las propiedades antes mencionadas de ambos polímeros. Esto supone que las dos, o como mínimo, una de las dos fases que se pretenden combinar deben emplearse en el estado disuelto, es decir, no entrecruzado. Para aumentar la estabilidad y conseguir una mayor compatibilización de ambas fases, adicionalmente, se puede considerar la funcionalización de PEA y su entrecruzamiento químico con HA.

Teniendo en cuenta esta consideración, el diseño de un posible biomaterial se limita a los sistemas modelo que se representan en la Tabla 1, conjuntamente con sus respectivos métodos de producción.

Para lograr el objetivo general, se han de cumplir otros **objetivos específicos** igual de importantes:

- ✓ Estudiar la solubilidad de HA y PEA y determinar los solventes compatibles o un solvente común, que no produzca ninguna

modificación química, degradación o efecto citotóxico en cada uno de los polímeros.

- ✓ Producir las mezclas compatibles (*blends*) HA-bl-PEA de diferente composición y, a su base, fabricar los sistemas combinados de diferente diseño, indicados en la Tabla 1.
- ✓ Considerar funcionalización de PEA para aumentar su compatibilidad con HA y el posible entrecruzamiento químico de las dos fases.
- ✓ Caracterizar los sistemas producidos en cuanto a su morfología, composición, estructura de fase, biocompatibilidad, propiedades mecánicas, estabilidad ante varias condiciones y tratamientos, así como su manejabilidad y manipulabilidad.

Tras un cumplimiento exitoso de los objetivos descritos anteriormente se detallarán las ventajas y limitaciones de cada uno de los sistemas combinados propuestos y se estimará su potencial como biomaterial en el campo de la ingeniería tisular.

Tabla 1. Opciones del diseño y métodos de producción de los sistemas combinados, planteados en presente proyecto.

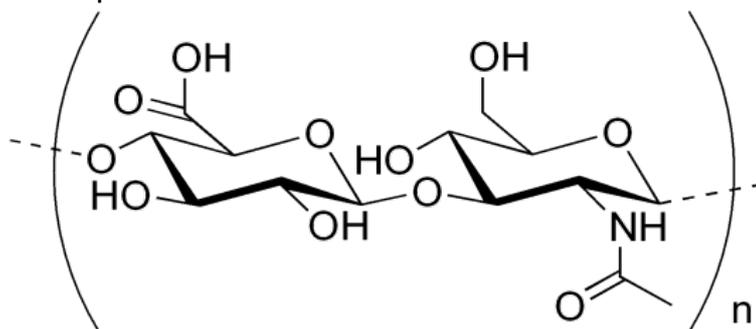
| # | Diseño | Método de producción | Estado de la fase HA | Estado de la fase PEA |
|---|---|--|----------------------|-----------------------|
| 1 | <i>films</i> bidimensionales | <i>solvent casting</i> | no entrecruzado | no entrecruzado |
| 2 | membranas hiladas | <i>electrospinning</i> | no entrecruzado | no entrecruzado |
| 3 | <i>scaffolds</i> tridimensionales | <i>freeze-extraction</i> | no entrecruzado | no entrecruzado |
| 4 | redes poliméricas semi-interpenetradas (<i>semi-IPNs</i>) | combinación acoplada al hinchamiento del componente acrílico | no entrecruzado | entrecruzado |

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

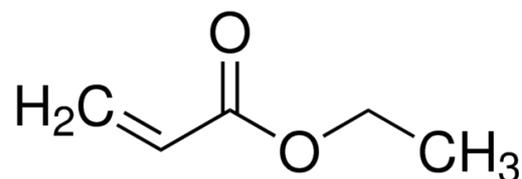
2.1. MATERIALES

2.1.1. Reactivos de síntesis

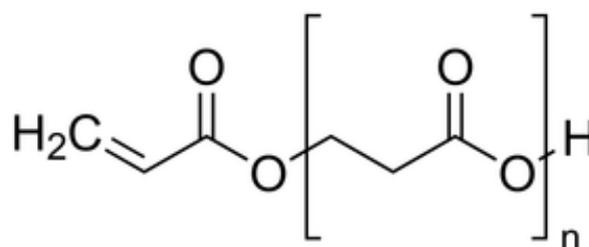
- ✓ Ácido hialurónico (Hyaluronic Acid, **HA**, de Sigma-Aldrich) en forma de hialuronato de sodio (99%), con un peso molecular total de $1.5-1.8 \times 10^6$ Da y el de la unidad repetitiva $M_w = 379$ g/mol, para producir sistemas combinados con polímeros acrílicos



- ✓ Acrilato de Etilo (Ethyl Acrylate, **EA**, de Sigma-Aldrich), $M_w = 100$ g/mol, como monómero acrílico para producir PEA y posteriormente, sistemas combinados con HA

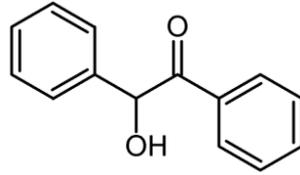


- ✓ 2-Carboxiacrilato de etilo (2-Carboxyethyl Acrylate, **CEA**, de Sigma-Aldrich), anhídrido, en forma de mezcla de oligómeros*, como monómero acrílico para producir PCEA y respectivos copolímeros con EA y posteriormente, sistemas combinados con HA

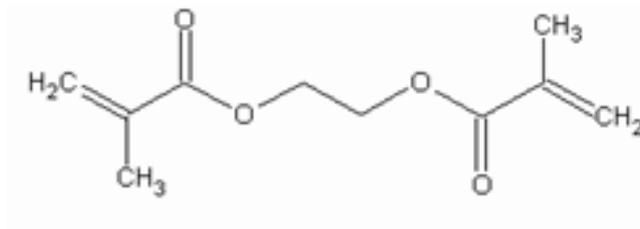


* datos del proveedor: $n=0...3$, $M_w \approx 170$ g/mol (promedio)

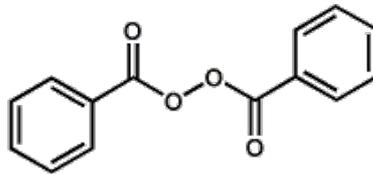
- ✓ Benzoina (de Scharlab), como fotoiniciador para la fotopolimerización de acrilatos en rayos UV



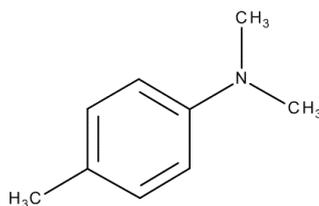
- ✓ Dimetilacrilato de etilenglicol (Ethylene glycol dimethacrylate, **EGDMA**, de Sigma-Aldrich), como agente entrecruzante para producir sistemas entrecruzados homo- y poliméricas a partir de monómeros acrílicos.



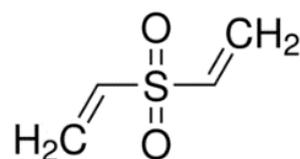
- ✓ Peróxido de benzoilo (Benzoyl peroxide, **BPO**, de Sigma-Aldrich), como iniciador térmico en la polimerización RedOx



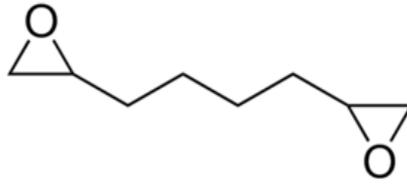
- ✓ N,N dimetil-p-toluidina (**DMpT**, de Sigma-Aldrich), como catalizador en la polimerización RedOx



- ✓ Divinilsulfona (Divinyl sulfone, **DVS**, de Sigma-Aldrich), como agente entrecruzante para Ácido Hialurónico en medio básico



- ✓ 1,2,7,8-Diepoxioctano (**DEO**, de Sigma-Aldrich), como agente entrecruzante para Ácido Hialurónico en medio ácido



- ✓ Nanotubos de Carbono (CNTs, de Sigma-Aldrich), no funcionalizados, de pared múltiple (*Multi-Walled Carbon Nanotubes*), con un 90% de base de carbono, de 6-9 nm de diámetro y 5 μm de longitud, como nanoagente reforzante para la matriz polimérica de HA y PEA.

2.1.2. Disolventes

- ✓ Agua desionizada (**W**), Etanol (**Et**) y Acetona (**A**), todos de Scharlab, han sido utilizadas en las pruebas de hinchamiento y solubilidad y para el lavado de los polímeros
- ✓ Ácido fórmico (>98%, **FA**, de Scharlab) ha sido empleado como disolvente común para la producción de sistemas combinados de HA-PEA y HA-P(EA-co-CEA), así como en pruebas de hinchamiento y solubilidad
- ✓ Hidróxido de sodio (**Sosa**), disolución 0.2M preparada a partir de NaOH puro (Panreac), ha sido utilizado en las pruebas de hinchamiento y solubilidad y también como catalizador para la reacción de entrecruzamiento de HA con DVS
- ✓ Dioxano, Isopropanol, Tetrahidrofurano, **THF**, N,N-dimetilformamida, **DMF**, Ciclohexano, Tolueno, Cloroformo, Metanol (todos de Scharlab), así como Tampón fosfato salino (Phosphate Buffer Saline, PBS, de Sigma-Aldrich) han sido utilizados en las pruebas de hinchamiento y solubilidad
- ✓ n-Octano (de Sigma-Aldrich) ha sido empleado en las medidas de densidades y en la determinación del volumen específico
- ✓ Agua extrapura (de Scharlab) y Dietilenglicol (DEG, de Sigma-Aldrich) han sido empleados en las medidas de ángulo de contacto

2.1.3. Ensayos de Citotoxicidad y Cultivos celulares

- ✓ Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (**DPBS**, de Gibco) ha sido utilizado como medio de lavado, extracción y acondicionamiento de los materiales poliméricos
- ✓ Dulbecco's Modified Eagle Medium con Rojo Fenol (**DMEM 1x**, de Gibco) ha sido empleado como medio de cultivo
- ✓ Suero Bovino Fetal (**FBS**, de Gibco) ha sido utilizado como suplemento proteico
- ✓ Penicilina-Estreptomicina (**P/S**, de Gibco) ha sido utilizada como suplemento Antibiótico-Antimicótico
- ✓ 0,25% Tripsina-EDTA 1x (de Gibco) ha sido empleada para la disgregación de las células
- ✓ CellTite96® Aqueous One Solution, Cell Proliferation Assay (de Promega), con el reactivo **MTS**, ha sido empleado para determinar la viabilidad celular
- ✓ reactivo **MTT**, bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (de Roche), ha sido empleado para determinar la viabilidad celular
- ✓ Nonidet P-40 (de Sigma), detergente para la solución de revelado de MTT
- ✓ Ácido clorhídrico HCl, 4 mM (de Sigma-Aldrich), componente de la solución de revelado de MTT
- ✓ Dulbecco's Modified Eagle Medium Sin Rojo Fenol (DMEM 1x, de Gibco), ha sido utilizado como medio diluyente para reactivos MTS y MTT
- ✓ Fibroblastos de la línea L929 (pases 7 y 8) ha sido utilizada como línea celular modelo para los ensayos de citotoxicidad, viabilidad y proliferación celular

2.2. FABRICACIÓN DE SISTEMAS COMBINADOS

2.2.1. Polimerización de acrilatos

La polimerización RedOx, debido a su rapidez y relativa sencillez, fue utilizada para hacer estimaciones preliminares sobre el carácter de polimerización de acrilatos, su rendimiento y cinética, con el fin de determinar las condiciones óptimas para toda la polimerización posterior. En este tipo de polimerización, el N,N dimetil-p-toluidina (DMpT), agente reductor, fue empleado como catalizador (promotor) de la reacción, y el peróxido de benzoílo (BPO), agente oxidante, fue empleado como el iniciador térmico, produciendo radicales libres que desencadenan la reacción entre los monómeros. El tiempo medio transcurrido entre la puesta en marcha de la mezcla de reactivos y hasta completar la polimerización fue de varios minutos, en función de cada monómero utilizado. El producto final (polímero) tenía aspecto irregular, adoptando la forma del recipiente que lo contenía (unos viales de vidrio pequeños), y la coloración amarilla-marrón proporcionada por las moléculas de DMpT atrapadas en el tejido polimérico.

Sin embargo, la técnica principal empleada para la obtención de polímeros acrílicos ha sido la fotopolimerización por UV, permitiendo obtener los polímeros en forma de films regulares, manejables, transparentes y no coloreados, a temperatura ambiente. Para llevar a cabo este tipo de polimerización, se prepararon montajes, cada uno de un molde de teflón encerrado entre dos placas de vidrio forradas con celofán; en el espacio delimitado por el molde se inyectó la mezcla reactiva, se selló el molde por encima y se puso en la estufa de UV durante toda la noche (≈ 12 h). El molde de teflón y el sellado de las placas fueron necesarios para evitar la pérdida de material por evaporación o goteo y también para proporcionar al film una forma regular (cuadrada o rectangular). El fotoiniciador utilizado en este caso fue la benzoína, al 1% en relación al peso total del monómero (o de la mezcla de co-monómeros, cuando fuera el caso). Para sintetizar los sistemas reticulados, a la mezcla reactiva también se le añadió etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) como agente entrecruzante, también al 1%. La mezcla reaccionante se dejó en agitación durante aproximadamente 30 minutos para la completa disolución del iniciador y obtener una mezcla homogénea, antes de proceder a su carga en los moldes. Transcurrido el tiempo de fotopolimerización, *overnight* ($\approx 12...14$ horas), los moldes sin abrir se colocaron en otra estufa a 90°C

durante 24h más para su post-polimerización, es decir, para garantizar una conversión elevada de los reaccionantes y facilitar la difusión de los compuestos no reaccionados.

Al final, los films sintetizados de PEA entrecruzada, PCEA y sus respectivos copolímeros se sometieron al doble lavado (de 12 horas cada uno) utilizando como mezcla de solventes, agua/acetona 70/30 v/v a ebullición, para producir un hinchamiento controlado de la matriz polimérica (Figura 4), con el propósito de eliminar los residuos de polimerización (restos no reaccionados de monómero, iniciador, entrecruzador, sustancias de bajo peso molecular que quedaron atrapados entre las cadenas poliméricas) que son impurezas que alteran las propiedades físico-químicas de los materiales y tienen un claro efecto citotóxico. Después del lavado, los materiales fueron sometidos al secado, en principio a temperatura ambiente durante toda la noche y posteriormente a vacío a 40°C durante 48h, para eliminar el agua/acetona absorbidas durante el lavado y posibles sustancias volátiles de bajo peso molecular que no fueron eliminadas de todo durante el lavado.

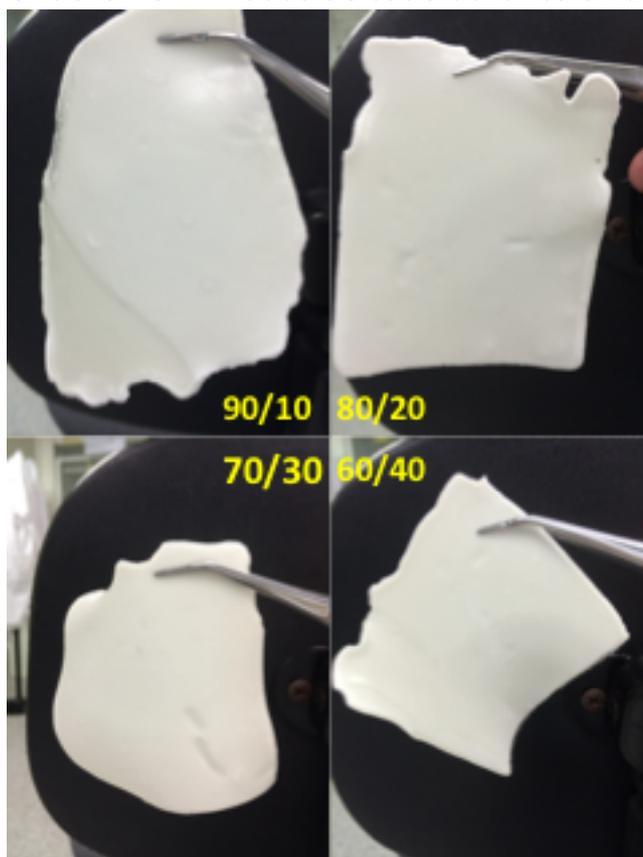


Figura 4. El aspecto hinchado de los sistemas P(EA-co-CEA) no entrecruzados durante su lavado.

El lavado del PEA no entrecruzado, destinado para preparar los films mediante la técnica de *solvent casting*, las membranas hiladas mediante

electrospinning y los scaffolds porosos mediante *freeze extraction*, se hizo disolviéndolo en acetona y luego precipitando la solución obtenida en agua desionizada, donde el PEA volvía a condensarse formando un tejido poroso de color blanco que posteriormente fue sometido a un secado de 24h a vacío a 40°C. El proceso de lavado se repitió varias veces.

2.2.2. Preparación de mezclas HA-PEA

El HA se disolvió en ácido fórmico a temperatura ambiente, con agitación magnética *overnight*, en un rango de concentraciones desde 1% hasta 3%, w/v, siendo la concentración final elegida la de 2,5% (2,5g de HA en 100 mL de FA). Las disoluciones del PEA no entrecruzado se prepararon bajo las mismas condiciones que las de HA, aunque el rango de concentraciones probadas en este caso fue de 3% hasta 6%, w/v, siendo la concentración final elegida la de 5% (5g de PEA en 100 mL de FA). Las dos disoluciones eran transparentes, homogéneas y viscosas y se guardaron en la nevera a 4°C, siendo sacadas a temperatura ambiente unas horas antes de cada uso. La solución HA_FA se mantenía siempre envuelta con un papel de aluminio dado el carácter fotosensible del ácido hialurónico. Los nanotubos de carbono, en su caso, se añadieron a cada solución preparada, sometiéndola posteriormente a una sonicación adicional con ultrasonido para garantizar una distribución uniforme de los nanotubos. Para preparar las mezclas HA-PEA con diferentes composiciones, se mezclaron las cantidades previamente calculadas de las dos soluciones, en función de sus concentraciones, y la mezcla resultante se mantuvo bajo agitación magnética durante 30 minutos con el fin de obtener una mezcla homogénea antes de proceder al tratamiento posterior.

Los *films* de HA, PEA y de sus mezclas (*blends*) fueron preparados mediante la técnica de evaporación de solvente (***solvent casting***), para ello se utilizaron placas cristalizadoras de teflón. El proceso de evaporación de solvente se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 48 horas. En algunos casos, con el fin de acelerar y aumentar la evaporación de FA para prevenir la separación de fases entre HA y PEA/CEA y maximizar la homogeneidad del producto final, se aumentó la temperatura hasta 60°C y se aplicó vacío; bajo estas condiciones, la duración del proceso se redujo hasta 2-3 horas. En todos los casos, para eliminar las cantidades residuales del FA atrapadas entre las cadenas poliméricas, se realizó un post-tratamiento térmico utilizando vacío a una temperatura de 40°C durante

48-72 horas. Como sistemas control, se prepararon mezclas de HA y PEA en condiciones similares, pero usando agua como disolvente para HA y acetona en el caso de PEA.

Las membranas hiladas del HA, PEA y sus mezclas fueron producidas aplicando las técnicas de **co-electrospinning** y **electrospinning convencional**. En primer caso, se ensamblaba un montaje de 2 jeringas, cada una de las cuales fue cargada con su solución y propulsada con su máquina propulsora, con el flujo independiente de cada una. De este modo, el suministro HA_FA fue separado del PEA_FA y los dos componentes se mezclaban un poco antes de llegar a la aguja, en las proporciones determinadas por las velocidades de flujo de cada una. En el segundo caso, la única jeringa fue cargada con 8-10 mL de la mezcla ya preparada de las dos soluciones, en proporciones calculadas estequiometricamente. En ambos procedimientos, el voltaje aplicado era desde 18 kV para PEA_FA hasta 25 kV para HA_FA, tomando valores intermedios para los híbridos HA-PEA, la distancia de trabajo fluctuaba entre 15 y 20 cm (valores suficientes para permitir la evaporación del solvente y no desviar la deposición del jet del colector), y velocidad de flujo era entre 2 y 5 mL/hora (tratando de evitar el goteo y aparición de otro tipo de artefactos en vez de fibras).

Los *scaffolds* tridimensionales de HA_FA, PEA_FA y sus respectivas mezclas fueron producidos aplicando la técnica de **freeze extraction**. Para esto, la solución polimérica en FA, de 5-10 mL de volumen, preparada en un pequeño vial de vidrio, se sometía a la ultracongelación instantánea en N₂ líquido en inmersión, con la ruptura posterior del vial e incubación posterior del cilindro obtenido en isopropanol frío, a -18°C, con varios cambios de medio, durante 5-7 días, con el fin de eliminar todo el ácido fórmico presente en el material (aprovechando que temperatura de fusión de FA es de +8°C), y una liofilización final.

Las redes poliméricas semi-interpenetradas (**semi-IPNs**) de PEA-HA fueron producidas mediante incubación de los discos de PEA entrecruzado, de 8 mm en diámetro, en la solución de HA_FA 2,5%, hasta llegar a un hinchamiento máximo, y después lavados en acetona y secados, con el fin de hacer condensar el ácido hialurónico atrapado en la red de PEA.

2.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS SISTEMAS PRODUCIDOS

La caracterización físico-química es fundamental para determinar tanto las propiedades de los sistemas poliméricos producidos, como evaluar el rendimiento y eficacia del propio proceso de su producción (sirviendo como control de calidad, en este último caso). En general, la caracterización consiste de un complejo de ensayos que pretenden:

- Estudiar la morfología de los materiales – su forma, tamaño/diámetro/grosor, transparencia/translucidez, uniformidad visual, microtopografía de la superficie, entre otros parámetros
- Definir la composición actual de los materiales, su desviación de la composición esperada, su homogeneidad en todo el tejido de material
- Determinar la estructura de fases de los materiales, grado de interacción entre sus componentes, posible separación de fases
- Evaluar la estabilidad térmica y propiedades mecánicas de los materiales (resistencia a tensión/compresión, rigidez, etc.), cambio de otras propiedades con temperatura
- Estimar el grado de hidrofobicidad/hidrofilicidad de los materiales. Estudiar su comportamiento (hinchamiento, solubilidad, degradación) en disolventes de diferente naturaleza.
- Posteriormente, llevar a cabo la caracterización biológica – evaluar la biocompatibilidad *in vitro* de los materiales: el posible efecto citotóxico, y, en caso negativo, la respuesta celular (viabilidad, adhesión, proliferación, migración, diferenciación, etc...) que provocan/estimulan ellos sobre determinados tipos de células.
- A base de todo lo anterior, concluir sobre la aptitud, manejabilidad y condiciones óptimas de producción, almacenamiento y aplicación de los materiales probados, como biomateriales para Ingeniería Tisular.

2.3.1. Espectrometría Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR)

FTIR detecta la vibración y rotación de las moléculas en la región infrarroja del espectro electromagnético, permitiendo determinar los grupos funcionales y enlaces químicos presentes en una muestra. Con este fin, se utilizó un aparato Cary 630 FTIR de Agilent Technologies, trabajando en el modo ATR, con una resolución de 4 cm^{-1} y un número de pasos (escaneos) de 32 por cada muestra, igual que para cada medición de *background* entre muestras. Todas las muestras fueron tomadas en 3 réplicas y eran planas, con forma de barra rectangular o discos, cortadas desde un film o de una membrana de electrospinning, recién secadas a 40°C a vacío para asegurar su estado seco. Los resultados fueron presentados en forma de Transmitancia (%) en función del Número de Onda (*Wavenumber*, entre 650 y 4000 cm^{-1}).

2.3.2. Ensayo termogravimétrico (TGA)

El TGA directamente mide la masa de muestra en función de temperatura (calentamiento/enfriamiento) o tiempo (isoterma), así como la velocidad de cambio de masa con temperatura (normalmente, expresada como derivada de pérdida de masa). Este ensayo se realizó en un equipo TGA/DSC 2 STAR System de Mettler Toledo. Las muestras de 2-6 mg de peso fueron sometidas a una degradación térmica durante su calentamiento (con velocidad constante de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$) en atmósfera de nitrógeno (con el flujo de N_2 de $50\text{ mL}/\text{min}$). Con el fin de eliminar toda el agua y otras sustancias volátiles que puedan estar presentes en las muestras, a todas ellas fue aplicado el mismo pre-tratamiento térmico, que consistía en un calentamiento desde T^{a} a 120°C , mantenimiento a esta temperatura durante 15 minutos y un enfriamiento posterior hasta 50°C , temperatura desde la cual ya se comenzaron a tomar los datos en un calentamiento normal hasta 800°C . Los valores de la masa (en mg) respecto a temperatura fueron normalizados sobre la masa inicial de cada muestra (en mg) para poder representarlos como la masa residual (en %) frente a temperatura. Los valores de la derivada de pérdida de masa respecto a temperatura (en mg/s) también fueron normalizados sobre la masa inicial de cada muestra (en mg), obteniendo valores en s^{-1} , con el fin de hacerlos (y sus picos correspondientes) comparables entre distintas muestras.

Además de estudiar la estabilidad térmica de los materiales y la cinética de su descomposición, TGA nos permitió determinar y cuantificar la composición química de los materiales (a diferencia del FTIR, que devuelve una descripción más bien cualitativa que cuantitativa), midiendo de 3 a 5 réplicas para cada muestra.

El mecanismo molecular de la degradación térmica de un material polimérico es la ruptura de macromoléculas en fragmentos más cortos y así consecutivamente, con la correspondiente escisión de enlaces, movimiento y separación de las cadenas, etc., hasta formación de los productos lo suficientemente volátiles para abandonar la muestra. Y cada unidad estructural (cadena lateral, fragmento de la cadena principal, dominio, etc.), en función de su composición y temperatura, muestra un comportamiento característico durante este proceso, resultando en un perfil total de distribución específica de pérdidas de masa por temperaturas. Asimismo, la degradación de un sistema bifásica (A/B) a cada temperatura concreta (T) se puede describir con la siguiente ecuación:

$$\Delta m(T) = X_A * \Delta m_A(T) + X_B * \Delta m_B(T) \quad (1),$$

donde $\Delta m(T) = m_0 - m(T)$, es pérdida de masa total a temperatura T, medida en TGA; $\Delta m_A(T) = \frac{m_{A0} - m_A(T)}{m_0}$ y $\Delta m_B(T) = \frac{m_{B0} - m_B(T)}{m_0}$, son las pérdidas de masa de respectivos componentes a temperatura T, y se pueden medir con TGA de los materiales puros A y B; $X_A = \frac{m_{A0}}{m_0}$ y $X_B = \frac{m_{B0}}{m_0}$, son las fracciones másicas iniciales de componentes A y B en el sistema.

Como en un sistema bifásico $X_B = 1 - X_A$, sólo X_A queda como incógnita en la Ecuación 1, y entonces esta puede ser resuelta utilizando herramientas como *Solver* para minimizar la suma de errores cuadráticos entre pérdida de masa real, observada en un sistema bifásico, y la esperada para cada posible valor de X_A . Teniendo en cuenta que el masivo de datos devueltos por TGA es enorme, la viabilidad de este método para determinar las fracciones másicas de A y B en un material es indudable, cuando la degradación térmica de puros A y B no se solapa, es decir, ocurre a distintas temperaturas.

2.3.3. Determinación del volumen específico

El volumen específico (v_{sp}) de un material es el volumen ocupado por la unidad de su masa. Siendo el inverso de la densidad (ρ), es una propiedad intensiva de materia, ya que no depende de su cantidad. La densidad de materiales se determina indirectamente, utilizando el principio de Arquímedes:

$$\rho = \frac{m_A}{m_A - m_P} \cdot \rho_0 \quad (2),$$

donde m_A es el peso de las muestras secas, medido en aire, m_P es el peso de las muestras sumergidas en n-Octano, y ρ_0 es la densidad del propio n-Octano ($0,703 \text{ g/cm}^3$). Las mediciones se hacían con ayuda de una balanza de precisión Mettler Toledo AX205 equipada con un kit de accesorios de medición de densidad. Se procesaron cinco réplicas para cada muestra, siendo el volumen específico el promedio de los valores inversos de su densidad.

Además, para el cálculo de los valores teóricos esperados de los sistemas copoliméricos P(EA-co-CEA) se aplicó la siguiente ecuación:

$$V_{sp}(\text{copolímero}) = V_{sp}(\text{PEA}) * X_{EA} + V_{sp}(\text{PCEA}) * X_{CEA} \quad (3),$$

donde los volúmenes específicos de PEA y PCEA fueron obtenidos experimentalmente y las fracciones másicas actuales de cada componente X_{PEA} , X_{PCEA} fueron calculadas con TGA según descrito en el apartado 2.3.2.

2.3.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Este ensayo proporciona información cuantitativa y cualitativa sobre los procesos exo- y endotérmicos que reflejan los cambios físico-químicos que tienen lugar en una muestra durante su calentamiento o enfriamiento (como pueden ser una fusión, cristalización o transición vítrea). Para esto se empleó un calorímetro Perkin Elmer 8000. Con el fin de eliminar toda el agua y otras sustancias volátiles que puedan estar presentes en las muestras afectando a las transiciones térmicas estudiadas, y también para borrar el historial térmico de las muestras y ponerlas a condiciones de partida iguales, a todas ellas fue aplicado el mismo pre-tratamiento térmico (precalentamiento) descrito en el apartado 2.3.2. Lo seguía un enfriamiento hasta $-60 \text{ }^\circ\text{C}$, para asegurar la vitrificación completa de los materiales, y finalmente un calentamiento de $-60 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta $120 \text{ }^\circ\text{C}$, cuyos datos se

tomaron y se analizaron posteriormente. Tanto calentamiento, como enfriamiento se llevaron a cabo a una velocidad constante de 20 °C/min y con un flujo de nitrógeno como gas de purga de 20 mL/min. Cada tipo de muestra se analizó en 3 réplicas, con la masa entre 4 y 6 mg, encerradas en unas cápsulas metálicas con tapas pinchadas para permitir la salida de vapores o gases evitando posible inflación de las cápsulas. Para poder comparar los resultados de diferentes muestras, los valores de flujo de calor (HF) devueltas por el equipo con unidades de Potencia (mW = 10⁻³ W = 10⁻³ J/s) fueron convertidos en dQ/dT, con unidades de la capacidad calorífica (c_p, Jg⁻¹K⁻¹) mediante una conversión:

$$\frac{dQ}{dT} = \frac{HF (mW) * 60 \left(\frac{s}{min}\right)}{Ratio_calentamiento \left(\frac{K}{min}\right) * masa_muestra(mg)} \quad (4).$$

Los valores de temperaturas de inicio (T_{Onset}) y fin ($T_{Endpoint}$) de la transición vítrea fueron calculados por las intersecciones de las rectas tangentes de vidrio (*glassy line*) y de goma (*rubber line*) con la recta de transición (T_g line); la anchura de transición vítrea, ΔT_g , fue calculada como su respectiva diferencia ($\Delta T_g = T_{Endpoint} - T_{Onset}$).

El valor de T_g fue determinado como la temperatura a la que el área de vidrio (*glassy area*) se igualó al área de goma (*rubber area*), y solía prácticamente coincidir con el de *Midpoint*. El progreso de la desvitrificación se representaba como el % de incremento de *rubber* área (o % de disminución de *glassy* área), frente a temperatura. El salto de la capacidad calorífica en la T_g , Δc_p , fue obtenido como la diferencia entre valores correspondientes de líneas de vidrio y de goma en la T_g : $\Delta c_p(T_g) = c_p^G(T_g) - c_p^L(T_g)$.

Los valores teóricos, esperados de la T_g de los sistemas copoliméricos P(EA-co-CEA), para contrastarlos con los experimentales, fueron calculados según las ecuaciones de Fox (Ecuación 5) y Couchman-Karasz (Ecuación 6) que las relacionan con los valores de T_g de respectivos homopolímeros y las fracciones másicas de cada monómero en los copolímeros:

$$\frac{1}{T_g^{P(EA-co-CEA)}} = \frac{X_{EA}}{T_g^{PEA}} + \frac{X_{CEA}}{T_g^{PCEA}} \quad (5),$$

$$\ln [T_g^{P(EA-co-CEA)}] = \frac{X_{EA} * \Delta c_p^{PEA} * \ln(T_g^{PEA}) + X_{CEA} * \Delta c_p^{PCEA} * \ln(T_g^{PCEA})}{\Delta c_p^{PEA} * X_{EA} + \Delta c_p^{PCEA} * X_{CEA}} \quad (6).$$

2.3.5. Análisis dinamo-térmico-mecánico (DMTA)

Con esta técnica principal de caracterización mecánica se analizaron las propiedades viscoelásticas de sistemas poliméricos en función de temperatura, empleando el equipo Perkin Elmer DMA 800. Las medidas de módulo elástico (módulo de almacenamiento, E'), módulo viscoso (módulo de pérdidas, E'') y el tangente del ángulo de pérdidas ($\tan \delta = E''/E'$) de en las muestras cortadas en forma de barras rectangulares de 2 cm de longitud y 0,5 cm de anchura, fueron realizadas en un rango de temperaturas entre -80...-60 y +80...+120°C, a una frecuencia de oscilación de 1 Hz y la velocidad constante de calentamiento de 2°C/min. Por las limitaciones propias del equipo, no se ha podido aplicar el mismo pre-tratamiento térmico como en los ensayos de TGA y DSC; el enfriamiento de las muestras (a 10°C/min) hasta la temperatura inicial de ensayo y toda la regulación posterior de temperatura se hacía con ayuda de vapores de nitrógeno líquido que causaron la condensación de agua sobre las muestras, afectando en particular el comportamiento viscoelástico del ácido hialurónico.

2.3.6. Pruebas de hinchamiento/solubilidad

La finalidad de este grupo de ensayos es determinar el comportamiento de sistemas producidos en diferentes disolventes polares y no polares, notando el grado de hinchamiento (aumento de volumen) o solubilidad de cada material, si fuera el caso. En cuanto a sistemas no entrecruzados, destinados para tales aplicaciones como *solvent casting*, *electrospinning* o *freeze-extraction* (que necesitan un estado disuelto del material), es esencial conocer en qué disolventes y a qué condiciones dichos sistemas son solubles y cuando no lo son. De misma manera, en cuanto a los sistemas entrecruzados, conocer su grado de hinchamiento en diferentes medios es muy útil para determinar su manejabilidad y establecer el protocolo óptimo de su tratamiento post-polimerización: lavado, producción de *semi-IPNs*, etc.

Todas las pruebas de hinchamiento/solubilidad se hicieron sobre las muestras troqueladas en forma de discos regulares de 8 mm de diámetro, para que todas tuvieran la misma forma y un peso parecido. Básicamente, después de un secado exhaustivo de 48h a 40°C a vacío, se realizaba el pesado inicial (m_0 a t_0) en estado seco de los materiales y se procedía a su inmersión (Figura 5) en los viales con 10 mL de diferentes medios (disolventes), dentro de una incubadora (a $T_{\text{constante}}=37^\circ\text{C}$, en el caso de

agua desionizada, agua milliQ y PBS) o fuera de la incubadora (a T^a ambiental, en el caso de disolventes orgánicos), y se realizaban las posteriores mediciones de peso a diferentes tiempos, normalmente entre 1 y 3 semanas, hasta llegar a equilibrio (peso estable sin cambios significativos) o hasta notar el inicio de los procesos de degradación/desintegración/disolución (pérdidas significativas del peso de las muestras). Los datos de hinchamiento se representaban como el grado de hinchamiento, $\Delta m_i = (m_i - m_0)/m_0$ (expresado, en función de escala, en % o en número de veces, respecto al peso seco inicial) frente al tiempo (días de incubación). Se tomaron 3-5 réplicas de cada muestra y para pesar se empleó la balanza Mettler AE 240 (de Mettler-Toledo). En caso de pruebas de solubilidad, se realizaban a temperatura ambiente y en agitación continua, siendo el resultado anotado el aspecto final (disolución completa/parcial, desintegración, hinchamiento o sin cambios) del material tras 72h de inmersión con agitación, pero sin mediciones del peso.

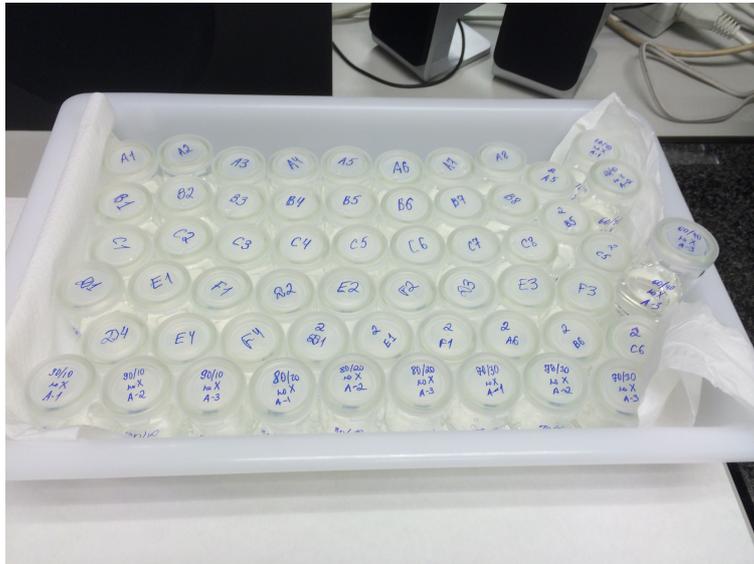


Figura 5. Pruebas de hinchamiento en inmersión.

2.3.7. Medición del ángulo de contacto

Las medidas del ángulo de contacto de materiales (o de su 'mojabilidad') suelen emplearse para determinar y cuantificar las propiedades superficiales de ellos, en particular, el grado de su hidrofiliicidad/hidrofobicidad, muy importantes para los biomateriales, ya que determinan las futuras interacciones interfásicas entre célula y material, como adhesión celular, adsorción de proteínas, etc. El ángulo de contacto depende principalmente de las fuerzas de adhesión y cohesión

entre las moléculas y se mide entre una gota de un líquido y la superficie de un material sólido, observando el carácter de expansión de la gota sobre la superficie sólida y notando la tendencia del líquido a extenderse o contraerse sobre ella. En caso de materiales hidrófilos, el ángulo de contacto medido con agua tiene un valor bajo, y en materiales hidrófobos, un valor elevado del ángulo de contacto se debe a la contracción del agua por el material (Figura 6).

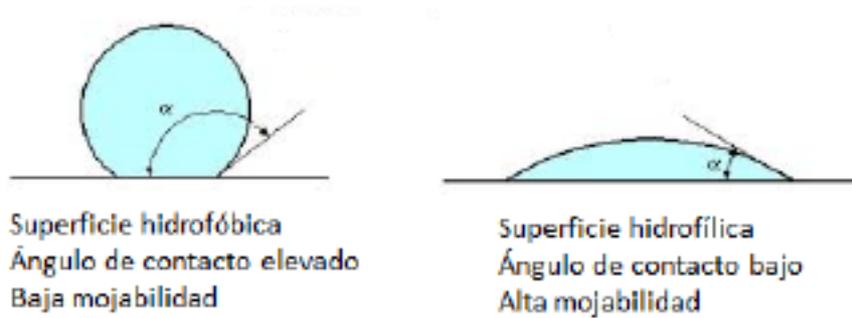


Figura 6. Medición del ángulo de contacto (θ).

El ensayo se realizó con un equipo DATAPHYSICS OCA20 (de DataPhysics Instruments GmbH), empleando agua extrapura y dietilenglicol como líquidos, con volumen de cada gota en torno de 2 μ L. Se mantuvo un margen de tiempo fijo de 10s entre depositar la gota y tomar su imagen correspondiente. Se hicieron 10 medidas para cada tipo de muestra, depositando las gotas solo en áreas planas y regulares de cada material.

2.3.8. Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Las muestras, previamente cubiertas con oro, fueron examinadas con un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 6300, con una aceleración del voltaje de 20 kV y una distancia de trabajo entre 10 y 20 mm, con el fin de estudiar la morfología de los materiales y, en el caso de membranas de electrospinning, estimar el diámetro de las fibras. Los sistemas combinados HA-PEA fueron sometidos al estudio con AFM con el fin de, mediante la estimación del módulo mecánico en la superficie de los materiales, determinar el tamaño y la distribución de los dominios de HA y PEA, aprovechando las diferentes propiedades mecánicas que tienen ellos en estado seco. Para esto fue empleado un equipo AFM Bruker MultiMode 8 en modo PeakForce Tapping.

2.4. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA *IN VITRO*

La caracterización biológica *in vitro* consiste en estudiar la interacción entre biomaterial y células, evaluando su biocompatibilidad y así estimando la posibilidad de su uso posterior *in vivo*. En principio, se estudia la citotoxicidad de los materiales, normalmente de manera indirecta (con extractos). El efecto citotóxico puede ser causado por el propio material (cuyo uso como biomaterial entonces será descartado) o debido a la presencia de los residuos tóxicos de polimerización o algún tratamiento posterior en los materiales producidos (que requerirá la optimización de condiciones de producción y/o tratamiento del material). En caso de ausencia de efectos citotóxicos en los materiales evaluados, se procede a estudiar la respuesta celular directa (viabilidad, proliferación y morfología) sobre los materiales con el tiempo de cultivo. Tanto para preparación de extractos, como para cultivos directos, se utilizaron los discos troquelados de los materiales a evaluar, de 8 mm de diámetro, previamente esterilizados con radiación δ (dosis de 25 kGy).

2.4.1. Ensayos de citotoxicidad *in vitro* con extractos de materiales

Para los ensayos de citotoxicidad descritos en el Capítulo 3 fueron preparados los extractos de materiales a evaluar (HA_FA, HA_Sosa, PEA_FA, PEA_A), mediante la incubación de las muestras en el medio de extracción (DMEM Basal sin rojo fenol y con el pH ajustado a 7,4) durante 48h a 37°C en un vaivén a 60 rpm, con una concentración de material en el medio del 5% (0,25g de cada material por 5mL del medio de extracción). El extracto de látex de la misma concentración se empleó como control positivo de citotoxicidad (CP), y el puro medio de cultivo – como control negativo de citotoxicidad (CN). Cabe mencionar que todas las muestras de HA y PEA previamente fueron lavados con Sosa, con el fin de neutralizar posibles cantidades residuales del ácido fórmico; aprovechando el pH básico de sosa, las muestras de HA además fueron entrecruzadas con DVS para prevenir su disolución en el medio de extracción. Antes de preparar los extractos las muestras fueron lavadas con el agua desionizada hasta mostrar el pH \approx 7, para eliminar posibles residuos de Sosa y DVS.

Las células modelo utilizadas en este ensayo fueron los fibroblastos de ratón de la línea L929, que se guardaron en fase 8, congelados en N₂ líquido con DMSO como crioprotector. Los fibroblastos, previamente

descongelados, fueron incubados a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ hasta llegar a subconfluencia y entonces fueron disgregados por tripsinización, contados en una cámara de Neubauer y finalmente sembrados en placas de 48 pocillos, en relación 3500 células/pocillo, con el medio de cultivo DMEM de 4 g de glucosa con rojo fenol. Al día siguiente después de la siembra, el medio en los pocillos fue sustituido con los extractos de las muestras correspondientes (400 µL para cada pocillo). En total, se utilizaron 5 réplicas para cada tipo de muestra (CP, CN y de cada material probado).

Estos ensayos se llevaron a cabo sin cambiar el medio de cultivo; la supervivencia celular fue evaluada a los tiempos de 1, 3, 7 y 14 días de cultivo. Para esto, tras quitar los extractos y lavar los pocillos con DPBS, a estos fue añadido (a 200 µL por pocillo) el medio DMEM sin rojo fenol y sin FBS, mezclado en relación 5:1 con un agente fotosensible de color amarillo, conocido como MTS o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2(4-sulfofenil)-2H tetrazolio, diluido en una solución de un reactivo de acople de electrones que le confiere estabilidad al producto [115]. El MTS inicialmente tiene color amarillo claro y, en presencia de coenzimas tipo NADPH o NADH y bajo acción la acción de las enzimas deshidrogenasas se reduce a formazano, un compuesto de color amarillo ocre / marrón oscuro (Figura 7), que tiene un pico de absorbancia característico detectable en un espectrofotómetro de UV/Visible. Dado que dichas enzimas sólo están activas en las células vivas, metabólicamente ágiles, la intensidad del color proporcionado por formazano dependerá del rango del número de células viables presentes en el cultivo a cuestión. Esto permite emplear el ensayo de MTS como una técnica analítica de colorimetría midiendo la densidad óptica (OD) como indicador del número aproximado de células vivas [115,116].

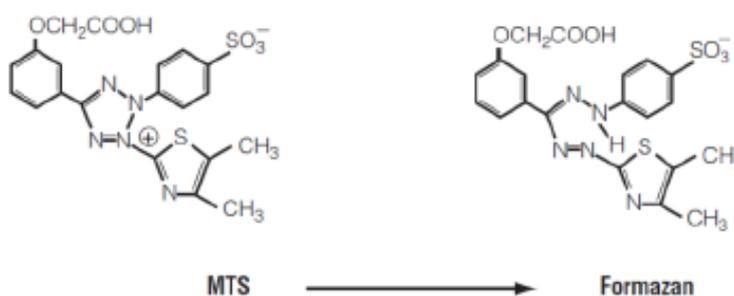


Figura 7. Reacción química fundamental para el ensayo de MTS.

Pasadas 3 horas de incubación en condiciones de oscuridad, a 37°C y en una atmósfera de 5% de CO₂, de cada pocillo fue extraída una alícuota de 100 µL transferida en una placa de 96 pocillos, y la OD (densidad óptica,

en forma de absorbancia a 490 nm) fue medida en un espectrofotómetro Victor3 de PerkinElmer.

Los ensayos de citotoxicidad con los sistemas combinados HA-PEA (Capítulo 4) y HA-Copolímero (Capítulo 6) se realizó de acuerdo con la **Norma UNE-EN ISO 10993-5**. En este caso, se utilizaron discos de polietileno ('covers') como control negativo (CN), ya que el polietileno no es citotóxico, y trozos de látex como control positivo (CP), debido a que el látex no permite el crecimiento celular por su toxicidad. Todos los materiales se pusieron a incubar durante 24h en el medio de extracción siguiendo una proporción según su área: 6 cm² por 1 mL de volumen del medio. La línea celular utilizada para el ensayo fueron fibroblastos de ratón L929 en fase 7, que fueron sembradas en una placa de 96 pocillos con una densidad celular de 10.000 células por pocillo y se incubaron durante 24 horas a 37°C, en un ambiente con 5% de CO₂ y humedad superior al 90%, hasta formar una monocapa semiconfluyente. Pasadas las 24 horas, 100 µL de cada extracto se transfirieron a cada uno de los pocillos con células. Se realizaron cuatro réplicas para cada tipo de extracto para tres tiempos de incubación distintos: 24, 48 y 72 horas. Al término de cada tiempo, las placas se observaron al microscopio y se realizó el ensayo de viabilidad celular empleando esta vez el agente MTT. Solamente las células vivas pueden reducir el MTT a formazano, generándose un color azulado si se produce la reacción, lo que permite cuantificar el porcentaje de células vivas. Para dicha determinación, se eliminó el medio de cultivo de las células y tras un lavado con DPBS, se añadieron 100 µL de una disolución preparada previamente que contenía el 10% de MTT y el 90% de DMEM sin rojo fenol. Tras esto, se incubó la placa correspondiente durante 2,5 horas a 37°C, se eliminó la disolución de MTT y se añadieron 100 µL por pocillo de una solución de revelado a base de isopropanol, 0,1% de Nonidet y 4mM HCl. Transcurrido 30 minutos, se procedió a su lectura en el espectrofotómetro Victor3 de Perkin Elmer, midiendo la absorbancia a 570 nm. A partir de los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de viabilidad celular entendida como la absorbancia de las muestras con respecto a la absorbancia de los blancos, que representan el 100% de viabilidad. Para el cálculo se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{100 \cdot OD_{570e}}{OD_{570b}} \quad (7),$$

donde OD_{570e} es el valor medio de la densidad óptica de los extractos de las muestras de ensayo, y OD_{570b} es el valor medio de la densidad óptica de los blancos. Para considerar una muestra como no citotóxica, la viabilidad de

las células sembradas en el extracto de dicha muestra debe ser superior al 70% de la viabilidad de los blancos a los 3 tiempos medidos: 24h, 48h y 72h.

2.4.2. Estudio de viabilidad y proliferación celular

Para estudiar la viabilidad y proliferación celular, se llevó a cabo un cultivo directo de la línea de fibroblastos L929 durante 1, 3 y 7 días sobre los materiales desarrollados. Las células eran las mismas que utilizados en el apartado 2.4.1, y siguieron el mismo protocolo de descongelación, incubación hasta subconfluencia, disgregación y contaje, pero fueron sembrados sobre los discos de materiales en relación ≈ 1000 células/disco, empleando para este fin un medio DMEM con rojo fenol, suplementado con 10% de FBS y 1% de P/S. Para facilitar la adhesión de fibroblastos, las placas con los discos sembrados fueron inmediatamente incubadas durante 1 hora a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, después de que los pocillos fueron rellenados con el medio de cultivo hasta completar 1 mL/pocillo, renovando el medio cada día.

Con objeto de determinar la viabilidad y la proliferación de los fibroblastos sobre los sistemas copoliméricos, a los tiempos de 1, 3 y 7 días de cultivo fue realizado el ensayo de MTS, similar al arriba descrito. A diferencia de lo anterior, tanto los discos destinados al ensayo como los pocillos donde estos se incubaron fueron lavados con DPBS para quitar el resto de rojo de fenol. Los pocillos se llenaron con el medio con MTS (400 μ L/pocillo), mientras que los discos se transfirieron a otra placa y también se cubrieron con en el medio con MTS (400 μ L/disco). Tras 3 horas de incubación a 37°C en oscuridad y bajo una atmósfera de 5% de CO₂, se tomaron alícuotas de 200 μ L y se transfirieron a una placa de 96 pocillos. La densidad óptica (absorbancia a 490 nm) fue medida en un espectrofotómetro Victor3 de PerkinElmer. Esa medición, por separado, en los discos y en sus pocillos correspondientes, sirvió para poder detectar los fibroblastos vivos que colonizaron los fondos y las paredes de pocillos en vez de los discos de muestras. Como control negativo de la proliferación se utilizaron los mismos discos, pero sin las células sembradas. Como control positivo se emplearon los cubres de vidrio del mismo diámetro, que muestran buena adhesión y proliferación celular.

La morfología de los fibroblastos proliferados en los materiales tras 7 días de cultivo, se estudió eligiendo los discos que mostraron los valores más altos de la densidad celular, tomando una serie de fotografías con ayuda del microscopio óptico Nikon Eclipse TS100 (con el zoom de 10x) con

una cámara Nikon ELWD 0,3 T1-SNCP conectada y un equipo auxiliar Nikon DigitalSight DS-L2.

CAPÍTULO 3. ÁCIDO FÓRMICO COMO DISOLVENTE COMÚN PARA EL ÁCIDO HIALURÓNICO Y EL POLIACRILATO DE ETILO

3.1. INTRODUCCIÓN

En las pruebas preliminares el ácido hialurónico (HA) manifestó buena solubilidad en agua y en los medios acuosos (por ejemplo, en sosa), pero fue insoluble en los disolventes orgánicos, tales como acetona, dioxano, tetrahidrofurano, dimetilformamida, diclorometano, cloroformo, etc. Por lo contrario, el poliacrilato de etilo (PEA) exhibió un comportamiento totalmente antípoda al HA, en cuanto a la solubilidad. Además, al mezclar las respectivas disoluciones de los dos polímeros, estos se precipitaron parcialmente, revelando incompatibilidad y escasa miscibilidad entre tales disoluciones. Tras una búsqueda exhaustiva de los disolventes que sean compatibles o comunes para tanto HA, como PEA, las pruebas de solubilidad enfocadas en los ácidos carboxílicos ayudaron a designar el ácido fórmico (FA) como el disolvente común, siendo descartada la otra opción, el ácido acético.

Ácido Fórmico, cuya estructura está representada en la Figura 8, es el ácido más fuerte de los ácidos carboxílicos saturados, con la constante de acidez $pK_a = 3.7$, fácilmente ionizable, con el peso molecular $P_M = 46.03$ g/mol, temperatura de fusión $T_M = 8.4$ °C y temperatura de ebullición $T_B \approx 101$ °C, por lo que tiene volatilidad relativamente baja. A temperatura ambiente, es un líquido, con un característico e intenso olor irritante, completamente miscible con agua y muchos disolventes orgánicos polares (etanol, acetona, etc.). FA tiene bajo índice de toxicidad, con un $LD_{50} \approx 1.8$ g/kg (oral, en ratones), se clasifica como irritante a concentraciones bajas (<10%) y corrosivo a las concentraciones altas (>10%), especialmente peligroso para la piel y los ojos, así como para vías respiratorias, en caso de sus vapores. Sin embargo, su forma diluida se considera un aditivo alimenticio por la FDA (EEUU), utilizado básicamente como un agente conservador y antimicrobiano [117–119].

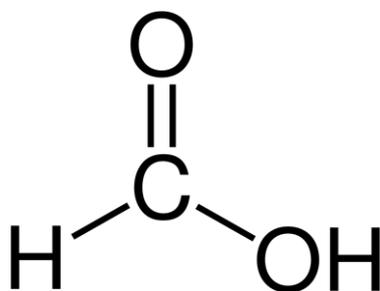


Figura 8. Fórmula estructural del ácido fórmico.

El próximo paso consistía en elaborar el protocolo de preparación de cada una de las disoluciones poliméricas (HA_FA y PEA_FA) y determinar su miscibilidad en diferentes proporciones, así como las condiciones óptimas para la obtención de sus mezclas homogéneas. En las pruebas preliminares, el FA se mostró como buen disolvente para el HA, hasta 3 w/v%, y PEA, hasta 6 w/v%, lo que hace posible la compatibilización de ambos componentes en unos sistemas híbridos HA-PEA basados en el disolvente común.

Sin embargo, antes de empezar a utilizar FA como tal disolvente, siendo el ácido más fuerte entre los ácidos carboxílicos saturados, es esencial comprobar que no causa la degradación o alteración química alguna en los polímeros solutos: por ejemplo, no corta cadenas de HA o no causa trans-esterificación de PEA, ni tampoco produce algunas sustancias citotóxicas a base de los dos polímeros.

Con este fin, se llevó a cabo un grupo de ensayos con los *films* poliméricos obtenidos vía *solvent casting* en ácido fórmico (según describe el apartado 2.2.2): HA_sc_FA y PEA_sc_FA, correspondientemente. Como control, fueron utilizados los *films* obtenidos vía *solvent casting* de HA disuelto en agua desionizada (HA_sc_W) y en Sosa (HA_sc_Sosa), así como el PEA disuelto en acetona (PEA_sc_A), de las mismas concentraciones y producidos en condiciones similares. Considerando los sistemas entrecruzados, también fue estudiado el efecto del ácido fórmico sobre el PEA entrecruzado, tras incubación e hinchamiento de sus discos en el ácido fórmico (PEA_X_FA), donde el control fue hecho con los discos del mismo material, incubados e hinchados en acetona (PEA_X_A).

3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los espectros de FTIR (Figura 9) no muestran alguna diferencia significativa entre PEA_sc_FA y PEA_sc_A a nivel de los grupos químicos. Sin embargo, cierta diferencia sí que se detectó entre las muestras de *solvent casting* del ácido hialurónico: HA_sc_FA, HA_sc_W y HA_sc_Sosa. Siendo ampliamente conocido el efecto de degradación de sosa sobre el HA (en forma de cortar sus cadenas), naturalmente, HA_sc_Sosa carecía de algunos picos expresados por HA_sc_FA y HA_sc_W, mientras que la mejor expresión de picos fue observada en HA_sc_FA. A base de lo observado en el FTIR, se puede concluir que el ácido fórmico no introduce nuevos grupos/enlaces ni elimina los ya existentes tanto en PEA, como en HA.

Los valores de volumen específico (Figura 10) tampoco muestran diferencias significativas entre PEA_sc_FA y PEA_sc_A, igual que entre PEA_X_FA y PEA_X_A, incluso entre las muestras de 1 y 3 días de incubación. No obstante, sí que se observaron dos fenómenos importantes: 1) el volumen específico del PEA entrecruzado fue ligeramente menor que el del PEA no entrecruzado - que es lógico, ya que el reticulado supone cierta “compactación” de las unidades moleculares; y 2) tras 21 día de mantenimiento a temperatura ambiente de su disolución en FA, el volumen específico de PEA sufrió una reducción significativa, lo que significa que a tiempo de interacción tan prolongado FA empieza a causar la degradación de PEA, cortando sus cadenas. En cuanto a HA, el disuelto en Sosa exhibe menor valor de v_{sp} que el disuelto en FA o Agua, confirmando que Sosa, efectivamente, contribuye en la degradación de HA, cortando sus cadenas.

En cuanto a los datos de TGA, DSC y DMTA (Figura 11, Figura 12), ellos no muestran alguna diferencia significativa entre los materiales, confirmando que FA no altera la composición de HA ni de PEA, ni tampoco la transición vítrea o las propiedades mecánicas de PEA. Un ligero desplazamiento de la degradación térmica a temperaturas más altas, igual que un incremento del módulo de almacenamiento (sobre todo, en la zona *rubber*), entre PEA_noX y PEA_X es la consecuencia lógica del entrecruzamiento de PEA.

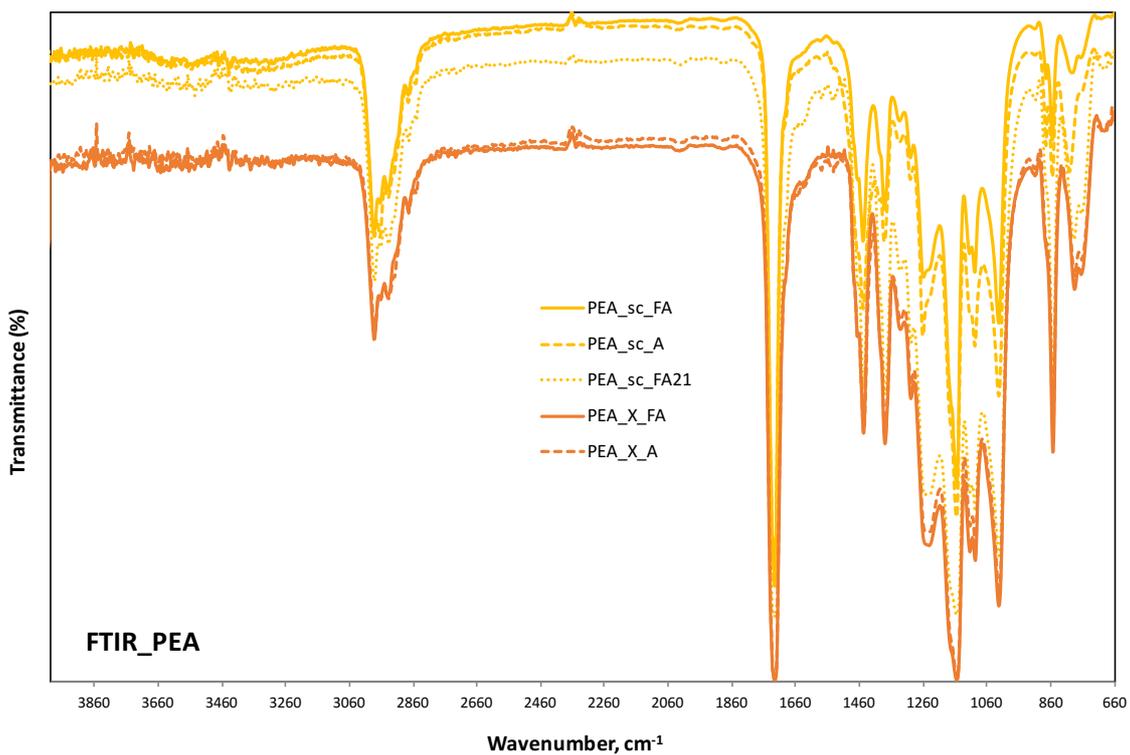
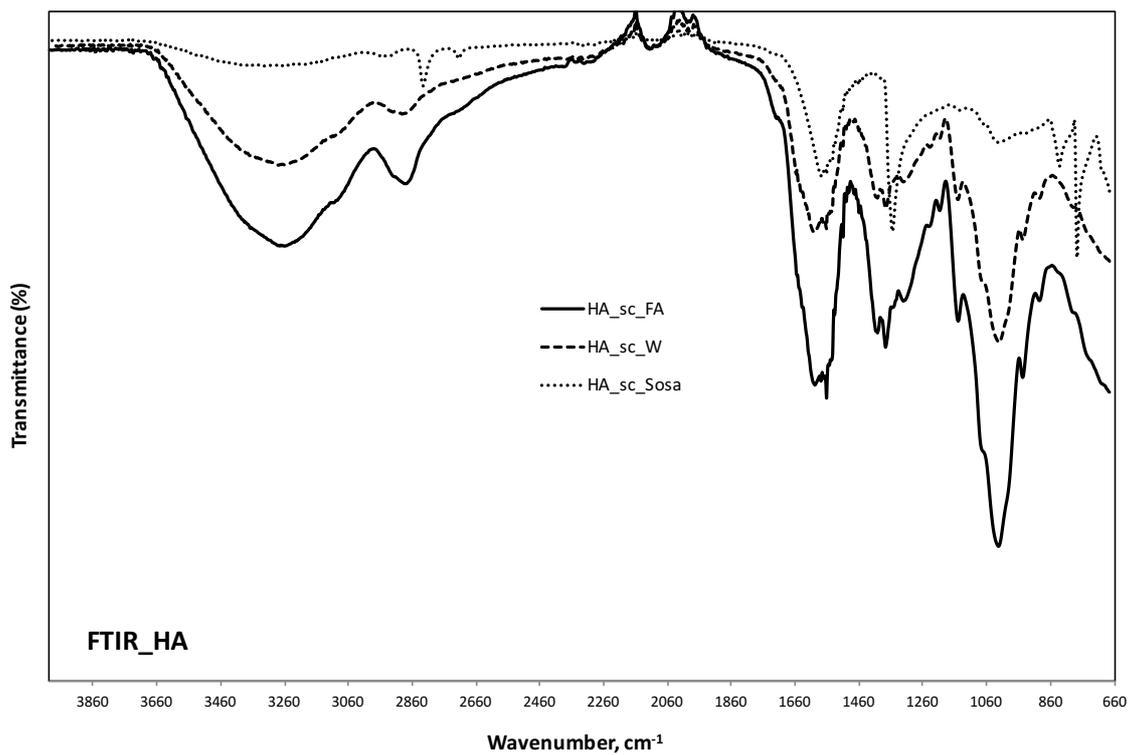


Figura 9. Espectros de FTIR de HA_FA (arriba) y PEA_FA (abajo).

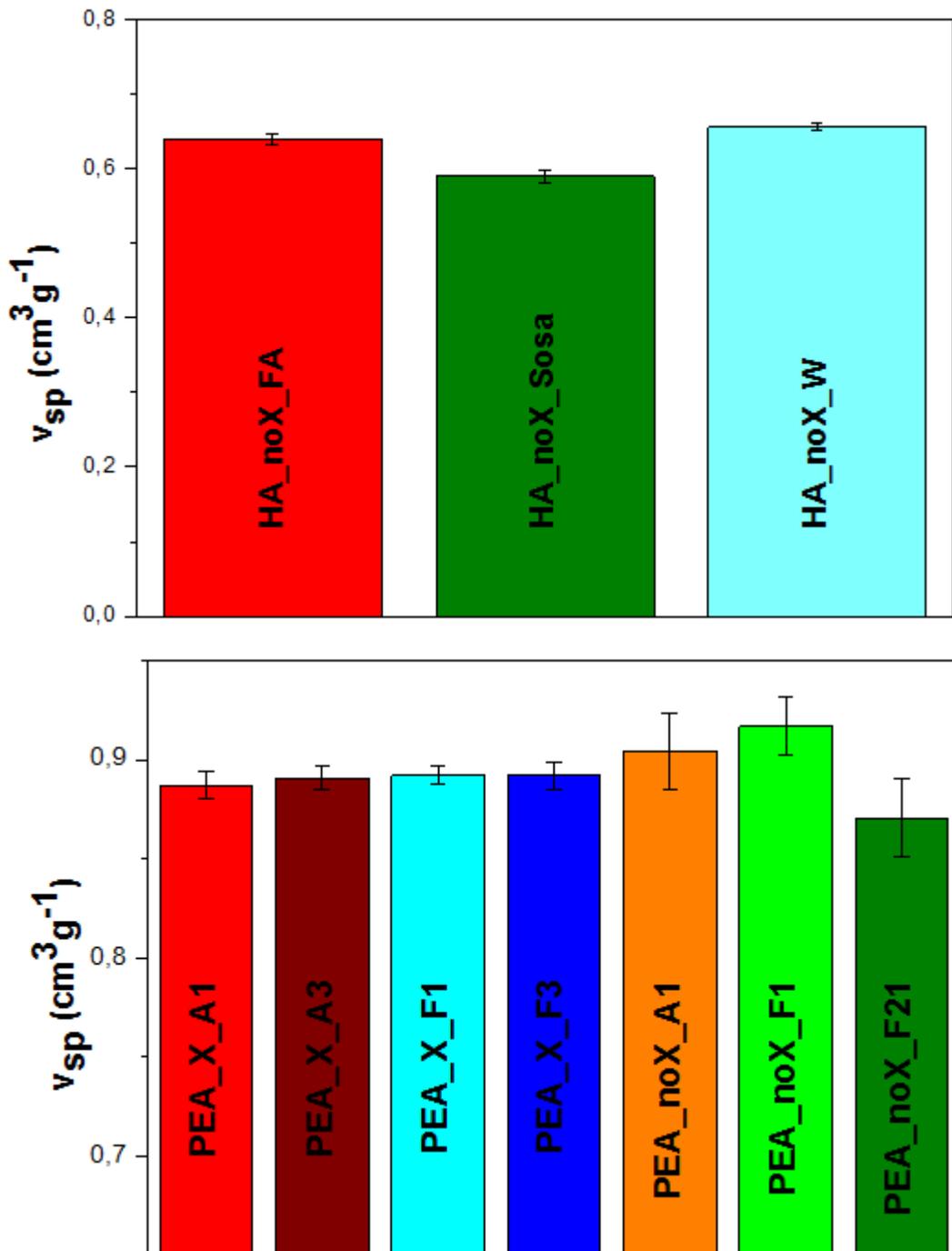


Figura 10. Arriba: volumen específico de films de HA obtenidos vía solvent casting de ácido fórmico, sosa y agua. Abajo: volumen específico de films de PEA entrecruzado ($_X$), tras incubación de 1 y 3 días en ácido fórmico y acetona, así como de los *films* de PEA no entrecruzado ($_noX$) obtenidos vía solvent casting de ácido fórmico y acetona. El número incluido en el nombre de cada muestra de PEA indica la duración (en días) de la incubación o la “vejez” de la disolución sometida a *solvent casting*.

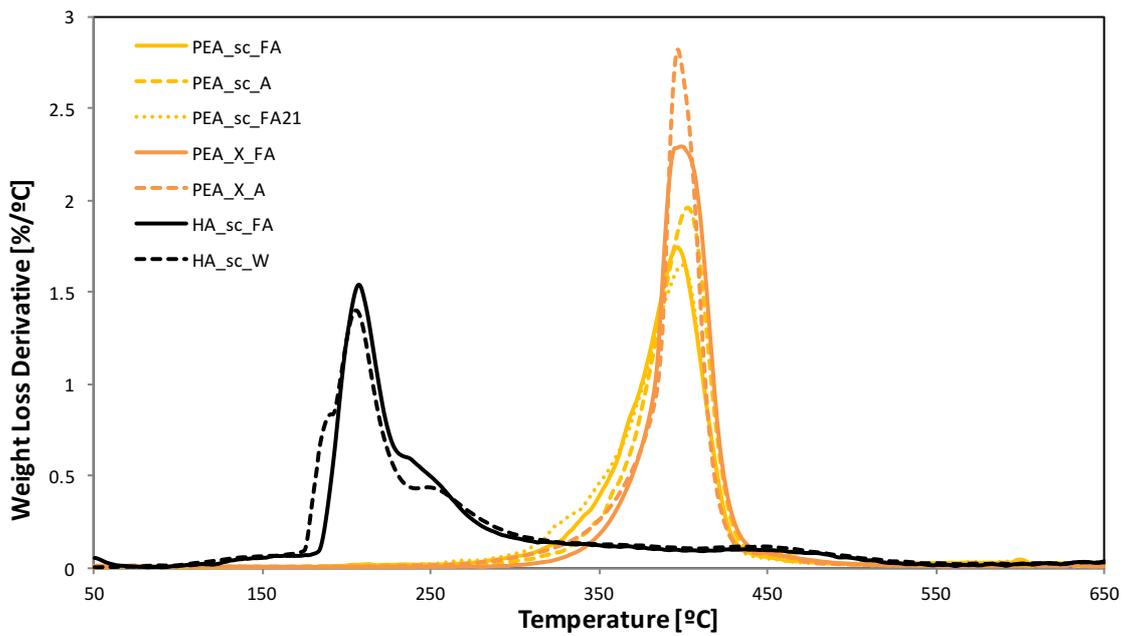
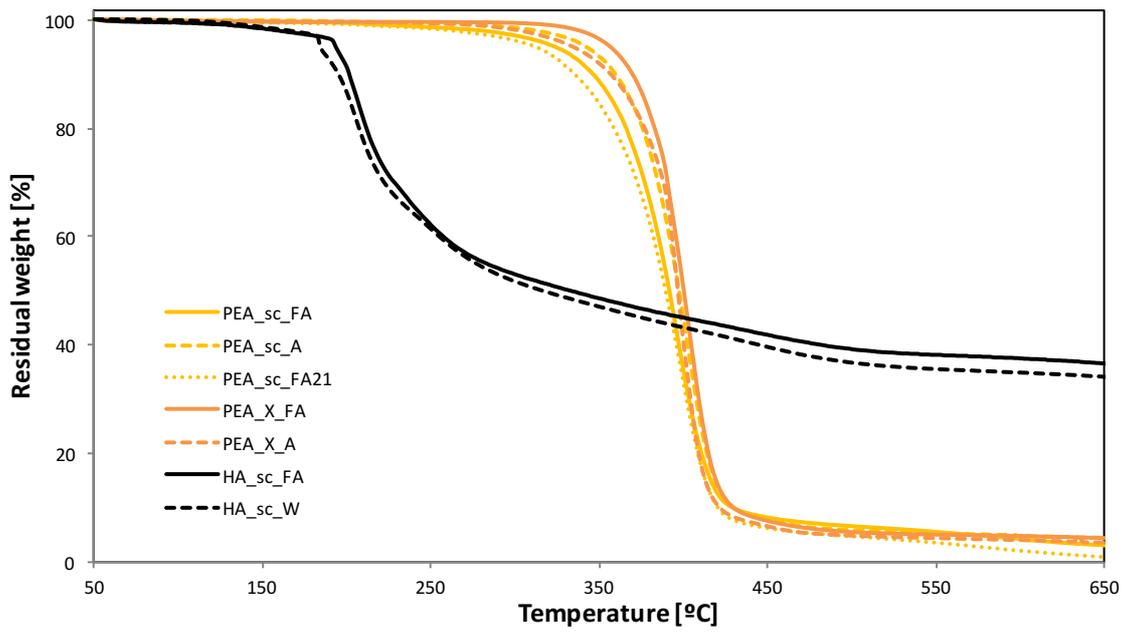


Figura 11. Termogramas de TGA de las muestras de PEA y HA: peso residual (arriba) y derivada de pérdida de peso (abajo), respecto a la temperatura.

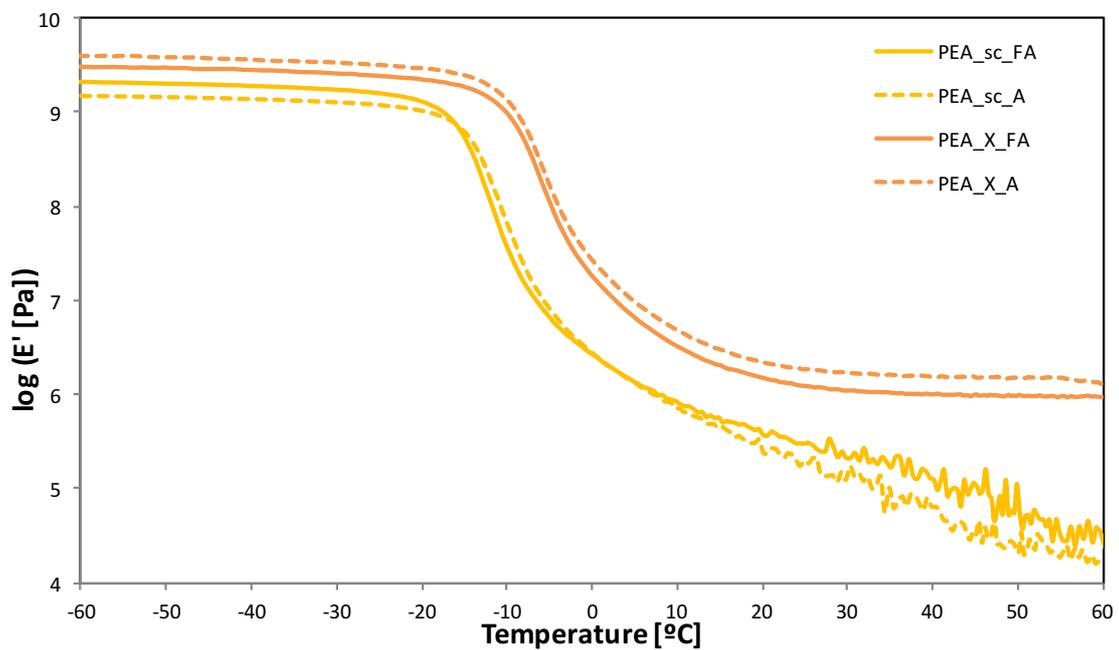
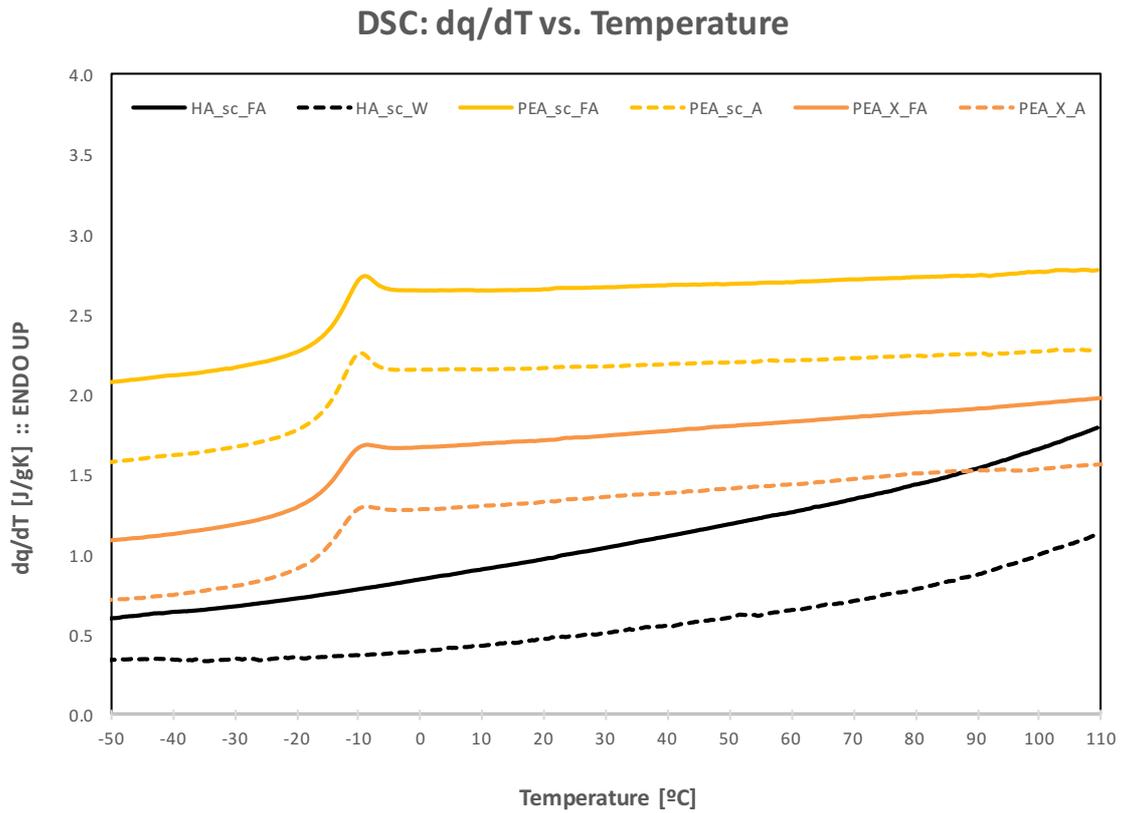


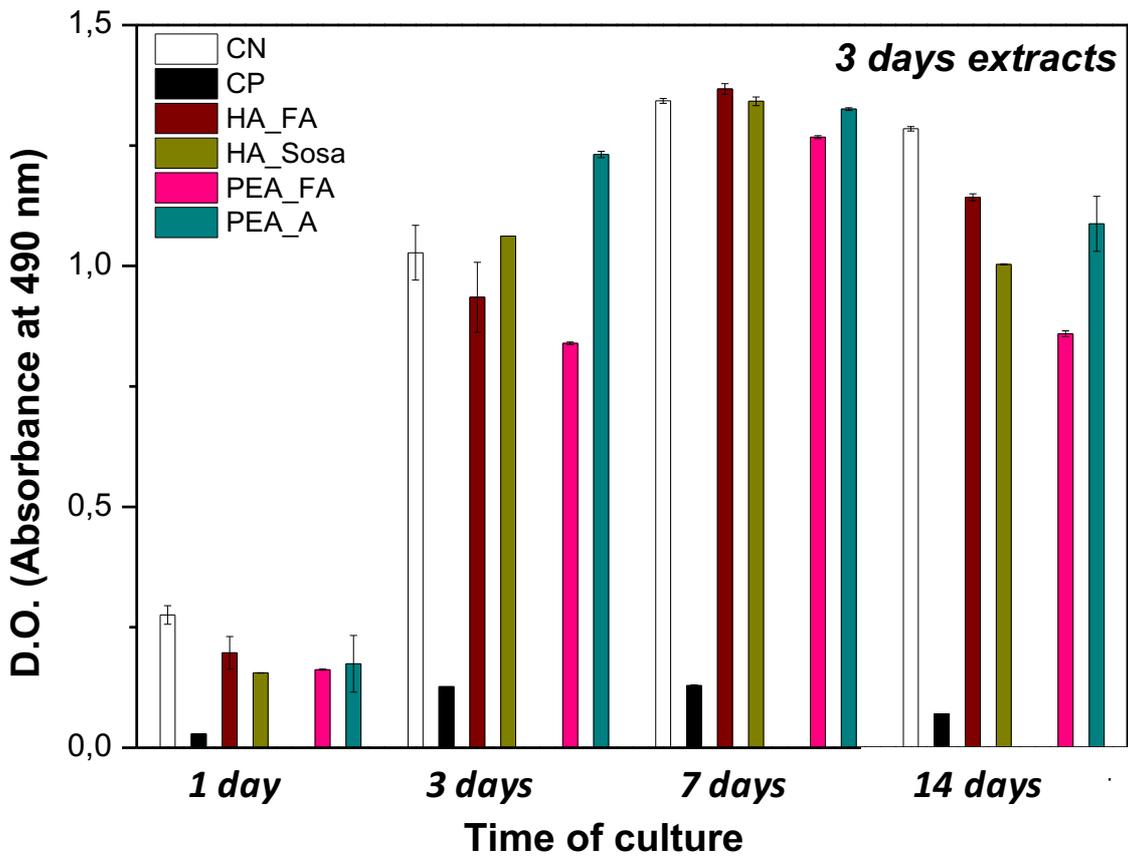
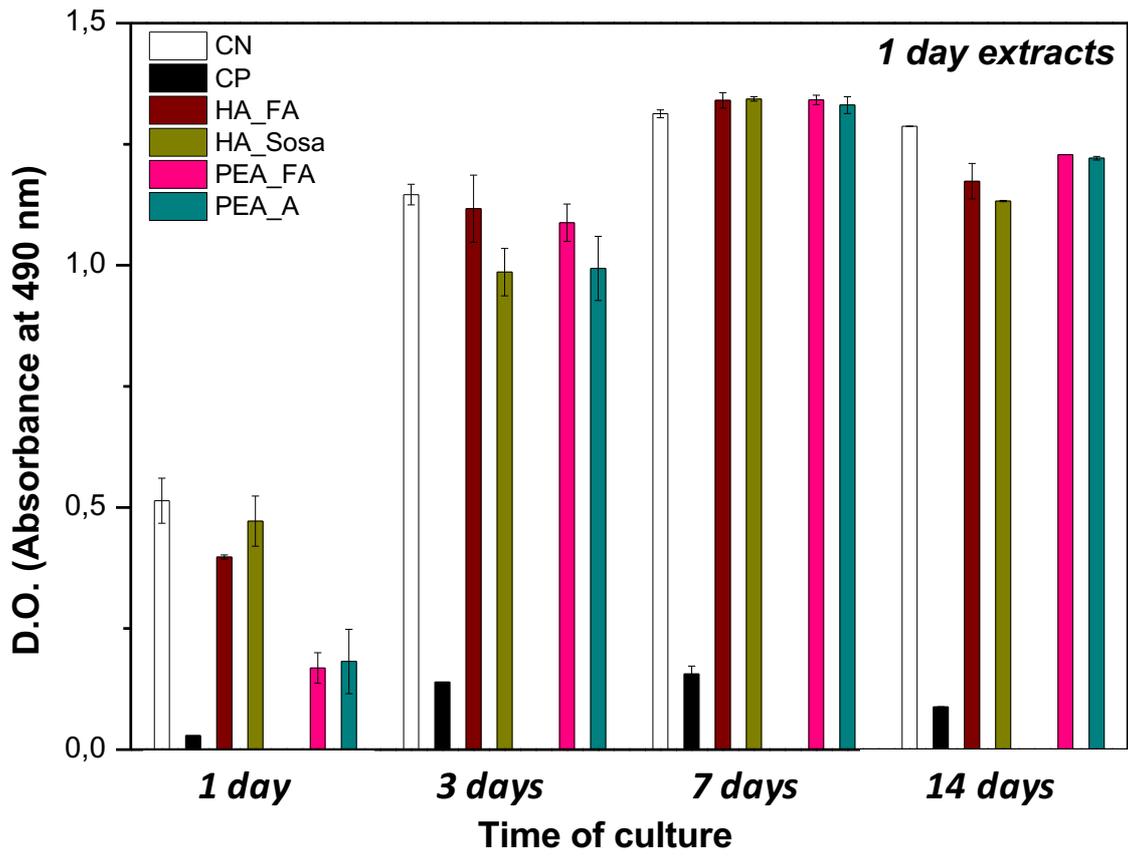
Figura 12. Termogramas de DSC (arriba) y DMTA (abajo) de las muestras de HA y PEA.

Las pruebas de hinchamiento del PEA_X mostraron (Tabla 2) su hinchamiento significativo en el ácido fórmico, que era el doble del hinchamiento alcanzado por el PEA_X en acetona (como control). A la vez, las pérdidas en peso de la matriz polimérica por posible desintegración/degradación tras su hinchamiento y posteriores lavado/desecado, eran muy leves, sin superar 1% del peso total inicial del polímero. El alto grado de absorción del FA por el PEA_X resulta en la retención parcial del FA, que en cantidades residuales queda atrapado entre las cadenas reticuladas de PEA incluso después de la extracción durante 24 horas a vacío a 40°C. Sin embargo, el lavado posterior de las muestras consiguió eliminar todo el FA todavía presente en las muestras. Estos resultados permiten esperar que el PEA_X va a hincharse de manera similar en la disolución del HA en FA, produciendo la entrada y retención de las moléculas de HA en la matriz reticulada del PEA, que al final puede resultar en la formación de *semi-IPNs* híbridas HA-PEA.

Tabla 2. Hinchamiento del PEA_X en ácido fórmico (_FA) y en acetona (_A), durante 1 y 3 días de incubación.

| Muestra | $\Delta m_{\text{tras incubación}}$ | pH _{tras extracción a 40°C a vacío} | $\Delta m_{\text{tras el lavado}}$ | $\Delta m_{\text{tras el secado final}}$ |
|-----------|-------------------------------------|--|------------------------------------|--|
| PEA_X_A1 | 254.44% ± 12.33% | 6.45 ± 0.21 | -0.24% ± 0.22% | -0.55% ± 0.34% |
| PEA_X_A3 | 243.15% ± 11.93% | 6.54 ± 0.14 | -0.23% ± 0.27% | -0.95% ± 0.12% |
| PEA_X_FA1 | 501.56% ± 13.21% | 6.32 ± 0.12 | -0.34% ± 0.75% | -0.52% ± 0.48% |
| PEA_X_FA3 | 503.25% ± 7.60% | 5.85 ± 0.18 | -0.35% ± 0.60% | -0.76% ± 0.39% |

Por último, fue comprobado que tanto PEA como HA, no liberan sustancias citotóxicas tras estar en contacto prolongado con el ácido fórmico (de 1, 3 y 7 días de extracción). Se ha mostrado una buena viabilidad de fibroblastos durante 14 días del cultivo en los extractos de PEA_FA, HA_FA, PEA_A y HA_Sosa (Figura 13), sin mostrar grandes diferencias entre HA_FA y HA_Sosa, así como entre PEA_FA y PEA_A.



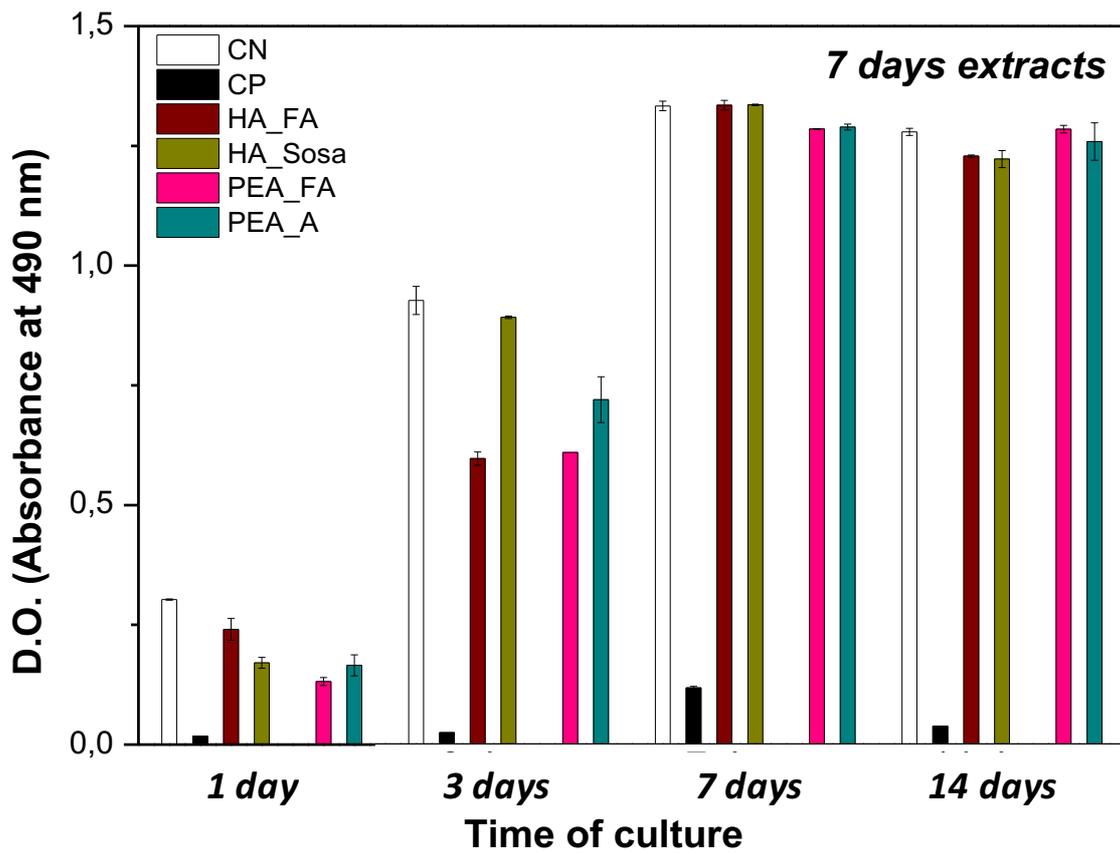


Figura 13. Resultados del ensayo de citotoxicidad con los extractos de PEA y HA obtenidos tras 1, 3 y 7 días de extracción.

3.3. CONCLUSIONES PARCIALES

En base de los resultados experimentales, obtenidos en este grupo de ensayos, se puede concluir lo siguiente:

- ✓ Tanto HA, como PEA, se disuelven bien en el FA, a temperatura ambiente y con agitación magnética, *overnight*, dando lugar a las soluciones estables, transparentes, homogéneas y viscosas.
- ✓ Dentro del rango razonable del tiempo de interacción (1-7 días) el Ácido Fórmico no produce modificaciones significativas en PEA ni en HA, ni causa liberación de compuestos citotóxicos de ellos, siendo su efecto comparable con el de acetona y agua, como respectivos disolventes para estos polímeros.
- ✓ Por tanto, queda confirmada la posibilidad del uso del ácido fórmico como disolvente común para producción de sistemas combinados del ácido hialurónico y poliacrilato de etilo.
- ✓ Después de hacer el *solvent casting*, queda cierta cantidad de FA residual atrapada entre las cadenas de HA (y prácticamente nada en PEA), por lo que hace falta un tratamiento adicional (temperatura + vacío, o lavados con agua), para eliminarlo.

CAPÍTULO 4. SISTEMAS COMBINADOS HA-PEA

4.1. INTRODUCCIÓN

Las soluciones de HA y PEA en Ácido Fórmico se manifestaron como completamente miscibles, sin producir turbidez o alguna otra alteración visible al ser mezcladas. En total, fueron preparadas las soluciones de 1-3 w/v% de HA_FA, y de 3-6 w/v% de PEA_FA, siendo la elección final las soluciones de 2,5 w/v% de HA_FA y de 5 w/v% de PEA_FA. A partir de ellas, se decidió preparar 3 tipos de mezclas, con la relación másica nominal HA/PEA = 70/30, 50/50 y 30/70, w/w%. A partir de estas mezclas (*blends*), y también de las soluciones puras de HA y PEA (como control), se planteó fabricar 4 tipos de sistemas combinados semidegradables:

- *films* bidimensionales, vía *solvent casting*,
- membranas hiladas, vía *electrospinning*,
- *scaffolds* tridimensionales, vía *freeze-extraction*,
- *semi-IPNs*, vía hibridación de PEA_X con HA_FA.

Consecutivamente, el trabajo fue estructurado en 4 bloques experimentales:

- ✓ Estudiar la posibilidad de producción de los *films* bidimensionales vía *solvent casting* de las mezclas arriba mencionadas. En el caso positivo, determinar las condiciones óptimas de la producción.
- ✓ Estudiar la electrospinabilidad de las mezclas, la posibilidad de producción a su base de las membranas hiladas vía *electrospinning* (o *co-electrospinning* simultaneo de las dos soluciones). En caso positivo, determinar las condiciones óptimas para la producción de membranas.
- ✓ Estudiar la posibilidad de obtener *scaffolds porosos* tridimensionales utilizando la técnica de *freeze-extraction*. En caso positivo, determinar las condiciones óptimas para la producción de los *scaffolds*.
- ✓ Investigar la posibilidad de preparar redes poliméricas semi-interpenetradas (*semi-IPNs*) mediante el hinchamiento de PEA entrecruzado en la solución de HA_FA. En caso positivo, determinar las condiciones óptimas de su producción.

4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.1. Preparación y caracterización de los *films* HA-PEA mediante la técnica de *solvent casting*.

Todos los *films* producidos eran homogéneos, transparentes o semitransparentes, de ≈ 0.5 mm de grosor (Figura 14). La rigidez de los films era notablemente proporcional al contenido de HA, mientras que su elasticidad y pegajosidad mostraron una clara correlación con el contenido de PEA. Este fenómeno se debe a que en estado seco a temperatura ambiente HA está en un estado vítreo, mientras que PEA – en un estado gomoso, siendo además un material muy pegajoso y por esto difícil de manejar.

Los espectros de FTIR (Figura 15) detectan la presencia de todos los grupos característicos procedentes de HA y PEA, y la intensidad de sus respectivos picos muestra buena correlación con la composición esperada de los materiales. Brevemente, se observa la banda ancha con el máximo a 3270 cm^{-1} , debida al estiramiento de los enlaces O-H (de los grupos hidroxilo y carboxilo) y N-H (amino), presentes en el HA. Unos picos entre 2840 y 2980 cm^{-1} corresponden al estiramiento de los enlaces C-H, presentes en ambos polímeros, y a los grupos $-\text{CH}_3$ (metilo) de PEA. Los picos intensos con el máximo en torno a 1720 cm^{-1} , se deben básicamente a las vibraciones del enlace C=O (grupo carbonilo) de PEA, mientras que los de 1570 - 1590 cm^{-1} , a los carbonilos y amidas de HA. Hacia frecuencias más bajas (1370 - 1440 cm^{-1}), los siguen los picos correspondientes a deformación de los enlaces CH_2 y CH_3 , así como a la combinación de C-O y C=O. Más allá, entre 1000 y 1160 cm^{-1} , se encuentran los picos debidos al estiramiento de enlaces C-O-C, C-O and C-O-H. Al final a las frecuencias más bajas se detectan los picos correspondientes entre otros al estiramiento CO-C, deformación O-H y C=O.

Las imágenes de AFM (Figura 16) muestran la distribución mutua de HA y PEA en sus respectivos híbridos, a base del diferente módulo de almacenamiento, E' , de los dos polímeros: el color blanco corresponde al módulo vítreo de HA, mientras que el color marrón (para el módulo) o amarillo (para su logaritmo), al de goma de PEA. Se observa que en la muestra 70/30 el HA es la fase predominante, a través de la cual están distribuidos los dominios de PEA de escala nanométrica ($<500\text{ nm}$). En la muestra 50/50, se nota la paridad y la mejor intermiscibilidad de ambas

fases, y en la muestra 30/70 se revela indudablemente el carácter predominante de fase PEA frente a la fase HA.

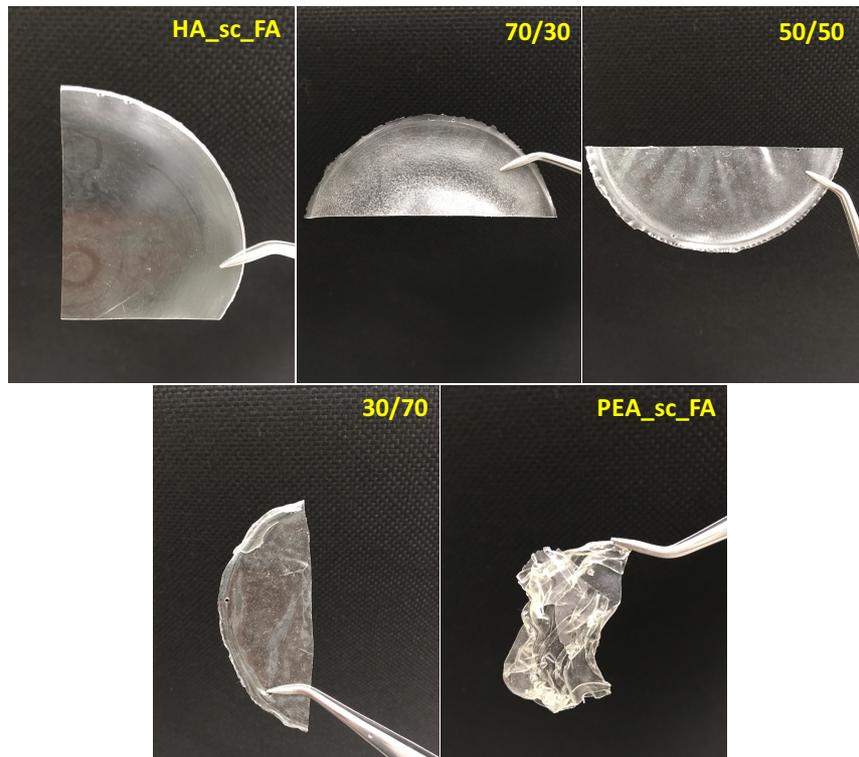


Figura 14. Fotos de los films HA-PEA, producidos vía solvent casting.

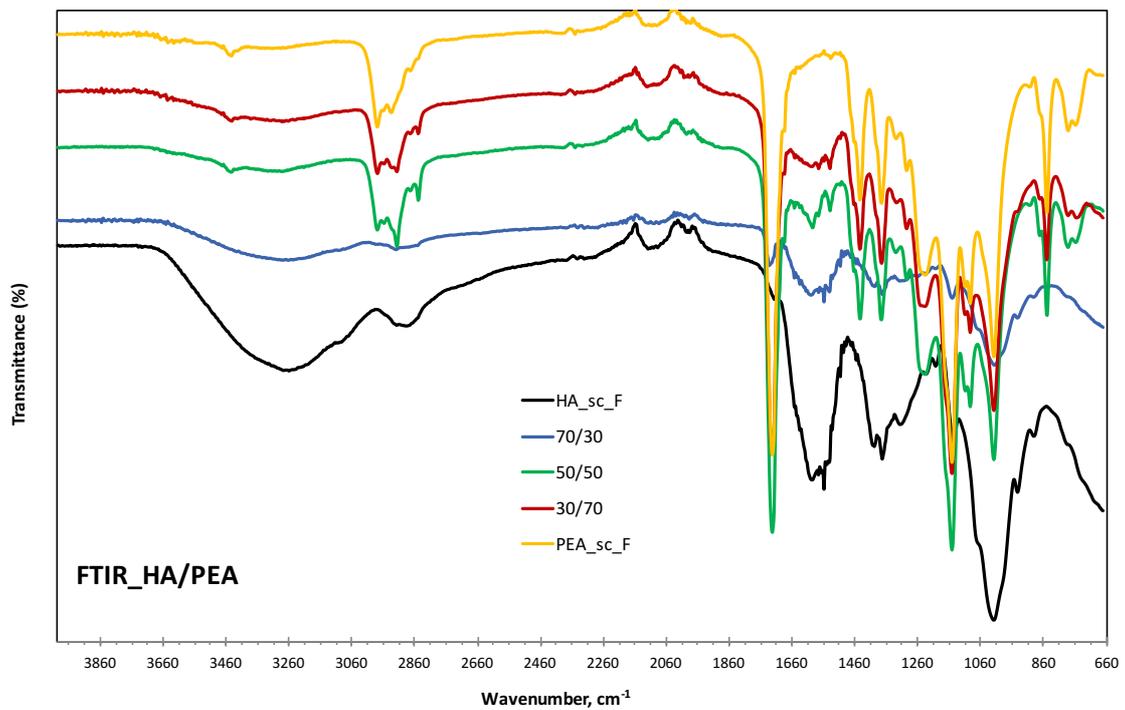


Figura 15. Espectros de FTIR de los films HA-PEA, producidos vía solvent casting.

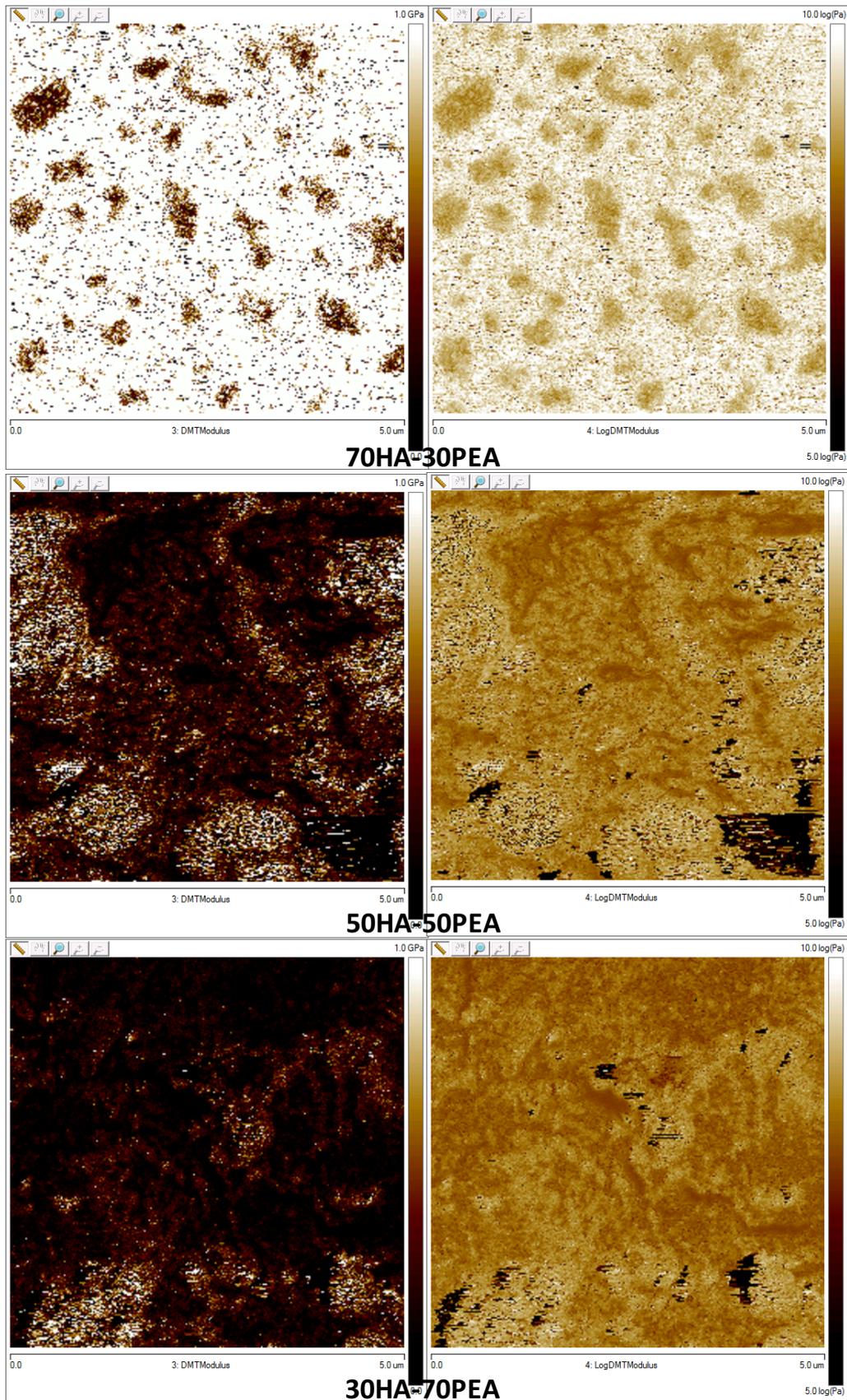
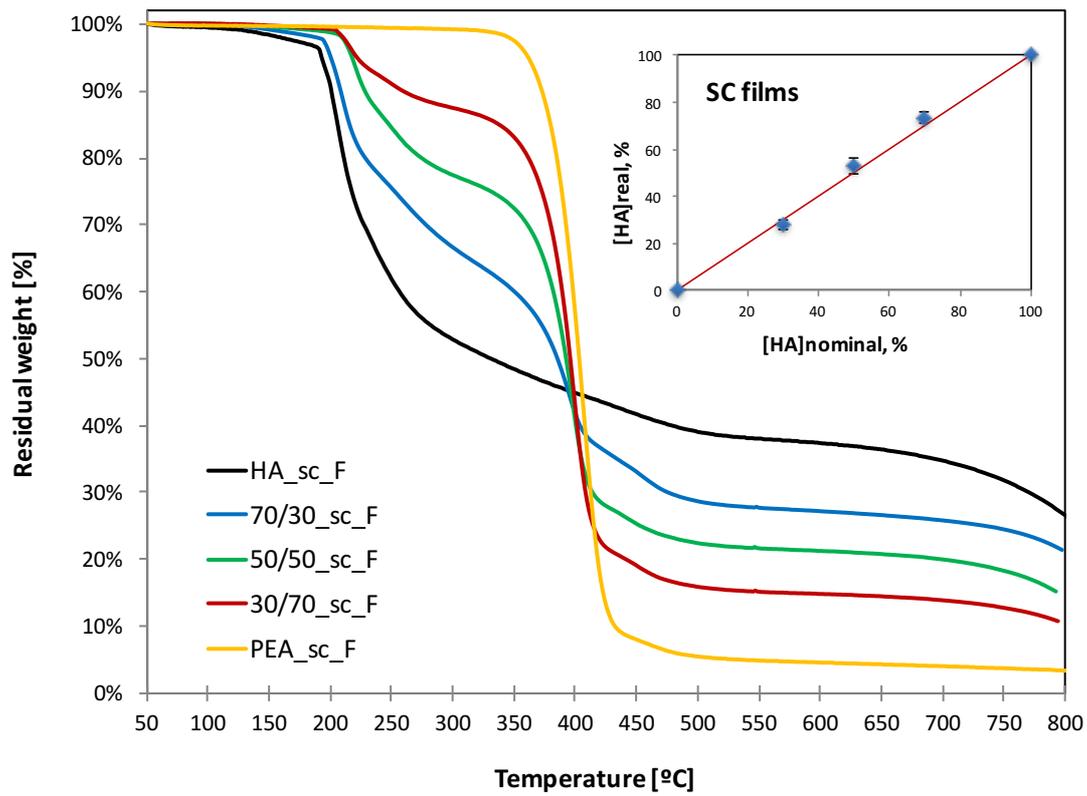


Figura 16. Imágenes de AFM de las superficies de los *films* HA-PEA, basados en el módulo de almacenamiento, E' (izquierda) o en su logaritmo, $\log(E')$, (derecha).

TGA: Residual Weight (SC films)



TGA: Weight Loss Derivative (SC films)

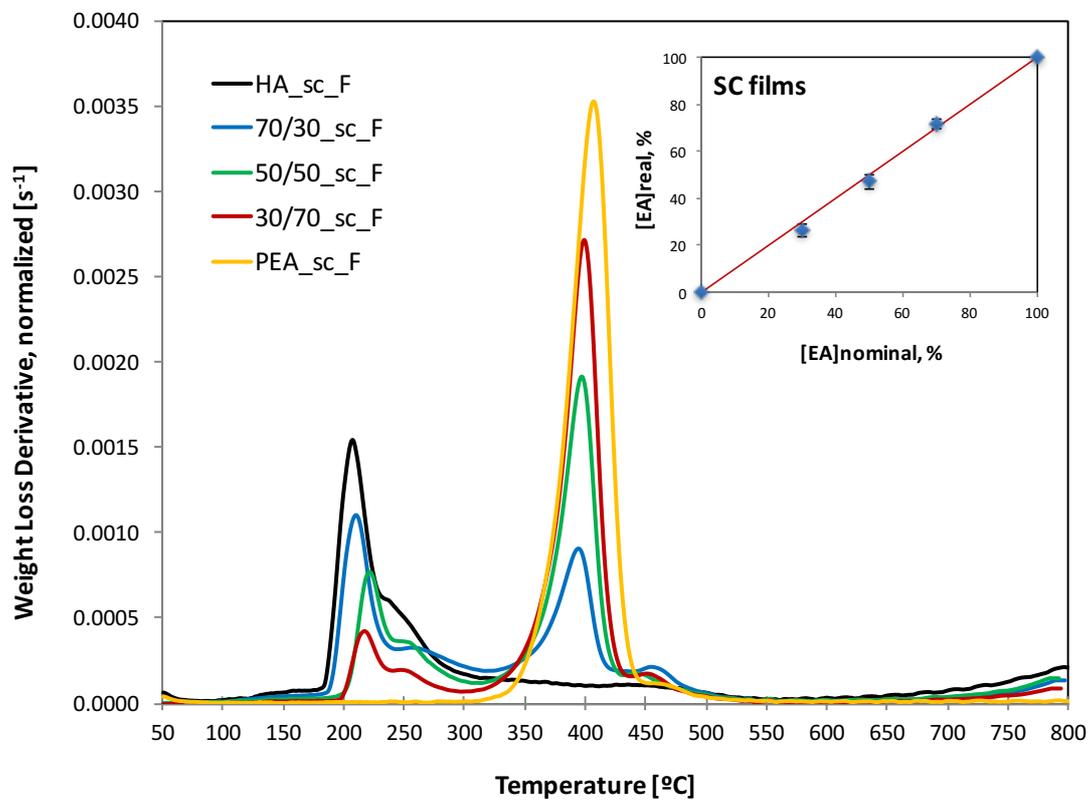


Figura 17. Termogramas de TGA de los films HA-PEA producidos vía solvent casting. Insertos: su composición actual frente a nominal.

Las termogramas de la masa residual y de la derivada de la pérdida de masa, representadas en la Figura 17, muestran que HA y PEA tienen perfiles de la degradación térmica muy diferentes. La degradación térmica del HA empieza a partir de 180°C y su etapa principal termina a 300°C, resultando en hasta 44% de la pérdida total de masa, después de lo cual ocurre una degradación más uniforme y mucho menos intensa, dejando a 600°C un residuo de >37% del peso total inicial. En el caso de PEA, la degradación es muy sencilla y principalmente ocurre en el rango de 310-485°C, resultando en más de 93% de la pérdida total de masa, y dejando a 600°C un residuo de <5% del peso total inicial. Los films HA-PEA muestran un comportamiento combinado exhibiendo perfiles intermedios de la degradación térmica, en función de su composición actual. Asimismo, se detecta la influencia mutua entre sus dos componentes, en forma de un ligero desplazamiento de los picos correspondientes a la degradación de fase HA a temperaturas más altas, y los correspondientes a la degradación de fase PEA, a temperaturas más baja.

Tabla 3. Contenido actual de los films HA-PEA y relaciones estequiométricas entre sus componentes.

| Materiales | Contenido actual (<i>SC films</i>) | | | | | |
|------------|--------------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | [HA] _{real} , % | [EA] _{real} , % | X _{real} (HA) | X _{real} (EA) | n _{HA} / n _{EA} | n _{EA} / n _{HA} |
| HA | 100.00 | 0.00 | 1.00 | 0.00 | - | 0.00 |
| 70/30 | 73.57 ± 2.45 | 26.43 ± 2.45 | 0.74 ± 0.02 | 0.26 ± 0.02 | 0.73 | 1.36 |
| 50/50 | 52.96 ± 3.17 | 47.04 ± 3.17 | 0.53 ± 0.03 | 0.47 ± 0.03 | 0.30 | 3.37 |
| 30/70 | 28.15 ± 2.18 | 71.85 ± 2.18 | 0.28 ± 0.02 | 0.72 ± 0.02 | 0.10 | 9.67 |
| PEA | 0.00 | 100.00 | 0.00 | 1.00 | 0.00 | - |

El carácter tan diferente de la degradación térmica de HA y PEA nos permitió calcular las fracciones máscas de HA y PEA en cada *film* y así determinar de manera viable su composición actual (Figura 17, Tabla 3). En general, esta no se desviaba significativamente de la nominal, indicando la presencia de las dos fases, tanto HA como PEA, en cualquier punto del material, aunque en proporción ligeramente variable. Esta variabilidad se debe a la duración relativamente larga del proceso de *solvent casting*, ≈48h, el tiempo suficiente para que (hasta que se evapore el ácido fórmico, dejando las moléculas poliméricas en estado seco inmóvil) las fases de HA y PEA empiecen a separarse y redistribuirse disminuyendo la uniformidad inicial de la mezcla, y dejando pequeñas heterogeneidades dentro del *film*.

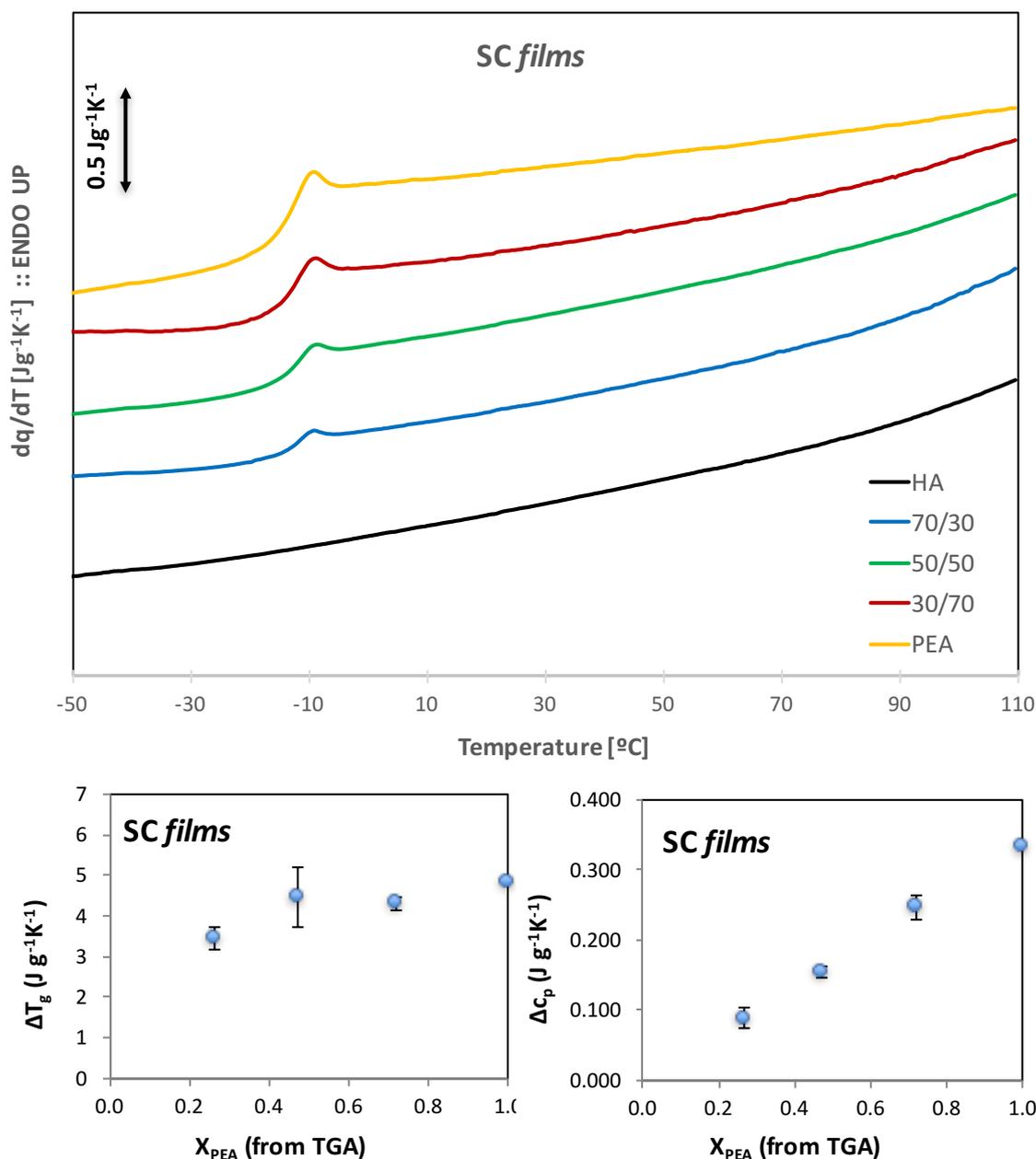


Figura 18. Arriba: Termogramas de DSC de los *films* HA-PEA producidos vía *solvent casting*. Abajo: algunos parámetros de la transición vítrea en función del contenido de PEA.

Tabla 4. Algunos parámetros de la transición vítrea de los films HA-PEA.

| Materiales | X _{PEA} , nominal | X _{PEA} , actual | Parámetros de la Transición vítrea | | | | |
|------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------------|--|---|-----------------------------------|----------------------|
| | | | T _g (°C) | ΔC _p (J g ⁻¹ K ⁻¹) | ΔC _p /ΔC _p (PEA) | ΔC _p /X _{PEA} | ΔT _g (°C) |
| HA | 0.00 | 0.00 | - | - | - | | - |
| 70/30 | 0.30 | 0.26 | -14.27 ± 0.50 | 0.089 ± 0.015 | 26.71% | 0.336 | 3.45 ± 0.29 |
| 50/50 | 0.50 | 0.47 | -14.40 ± 0.71 | 0.154 ± 0.007 | 46.30% | 0.328 | 4.47 ± 0.75 |
| 30/70 | 0.70 | 0.72 | -14.33 ± 0.41 | 0.247 ± 0.017 | 74.13% | 0.343 | 4.30 ± 0.15 |
| PEA | 1.00 | 1.00 | -14.20 | 0.333 | 100.00% | 0.333 | 4.84 |

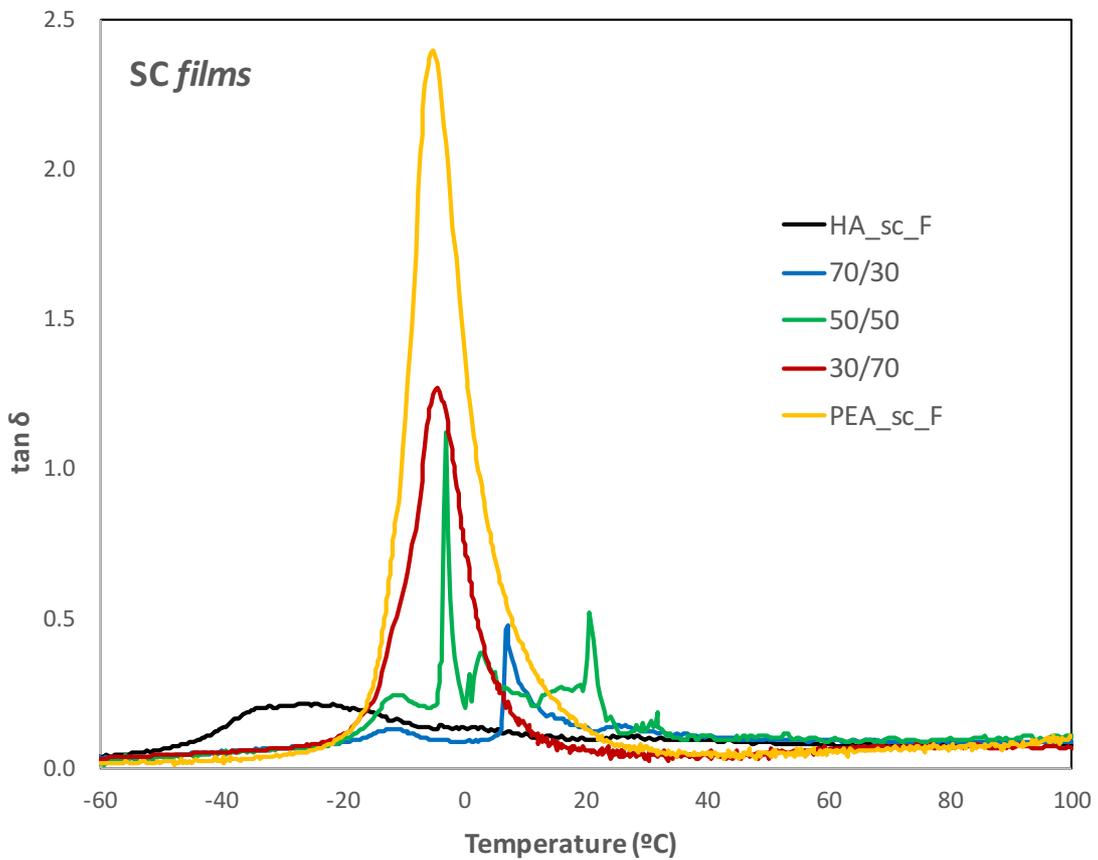
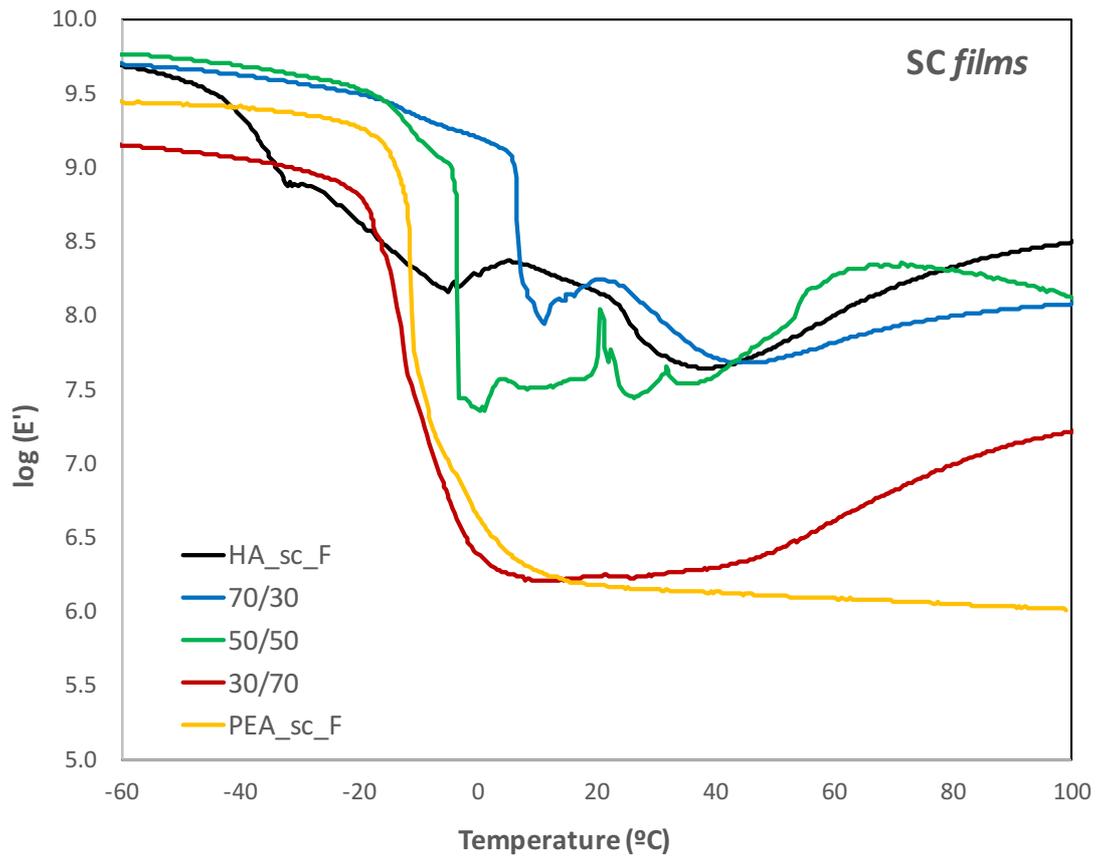


Figura 19. Termogramas del módulo de almacenamiento, E' (arriba) y del tangente del ángulo de pérdidas, $\tan \delta$ (abajo) obtenidos en DMTA de los films HA-PEA.

Los datos de DSC (Figura 18, Tabla 4) muestran que la transición vítrea de la fase PEA no se ve afectada por la presencia y la cantidad de la fase HA, en cuanto a cambios significativos de la temperatura de inicio, T_{onset} , o de la propia T_g . El incremento de Δc_p con el aumento del contenido de PEA en los *films* es proporcional a la cantidad creciente de la fase amorfa (PEA) disponible para sufrir la transición vítrea, ya que la fase HA no tiene transición vítrea a estas condiciones. Evidentemente, al normalizar los valores de Δc_p sobre el contenido de PEA en los materiales, se ve que tienen discrepancias mínimas entre sí, sin mostrar ningún efecto considerable por parte de HA. A la vez, cierta reducción de la ΔT_g con el aumento del contenido de HA en los sistemas puede reflejar la disminución de heterogeneidad entre los dominios de PEA en estas condiciones.

Las termogramas de DMTA (Figura 19) revelan el conjunto de fenómenos que ocurren en los materiales durante su calentamiento de -60°C a $+100^\circ\text{C}$, después de ser enfriadas con ayuda de los vapores del nitrógeno líquido. Tras mostrar los valores típicos del módulo vítreo, el HA muestra una pseudo T_g en torno de -30°C con el descenso posterior del E' , debido al contenido de agua absorbida durante la etapa de enfriamiento desde la humedad ambiental. A partir de -20°C el descenso del módulo E' en los *blends* y en el PEA puro se debe a la relajación principal, asociada a la transición vítrea de la fase PEA. Sin embargo, se destaca un llamativo incremento del módulo que empieza después de $+30^\circ\text{C}$ y que se observa en HA puro y en los *blends*, pero no en PEA puro. Dicho incremento se debe a la recuperación del estado vítreo de la fase HA, por su simple desecación con temperatura, y su expresión en todos los *blends* es una prueba sólida de la continuidad que tiene la fase HA en estos sistemas combinados, incluso a bajo contenido de HA (como en la muestra 30/70). Consecuentemente, los valores del módulo de goma en los *blends* reflejan el contenido de HA en ellos, mientras que en el PEA puro el valor de módulo va cayendo con temperatura, de acuerdo con el estado no entrecruzado del polímero.

No obstante, las pruebas posteriores revelaron un desperfecto importante de los *films* HA-PEA producidos. Por un lado, los *films* de HA_sc_FA se disolvían completamente en agua (en inmersión, a temperatura ambiente) en cuestión de 1-2 minutos de agitación, que es el comportamiento normal y esperado del ácido hialurónico no entrecruzado. Sin embargo, considerando la insolubilidad total de PEA en agua, y el alto grado de intermiscibilidad entre las fases HA y PEA detectada en sus *blends*,

se esperaba que la fase PEA serviría de protectora, minimizando la solubilidad en agua de la fase HA y ralentizando la degradación de estos sistemas híbridos en un ambiente acuoso – lo que es muy importante desde el punto de vista de la ingeniería tisular. Con este fin, se hicieron pruebas rápidas de degradación de materiales en agua (para estimar la estabilidad de la fase HA) y en acetona (para estimar la estabilidad de la fase PEA), consistiendo las dos en la incubación de los materiales en los estos medios durante 48 horas a temperatura ambiente, aplicando la agitación magnética. En ambos casos, se notaron las pérdidas significativas en el peso de los *blends*. Previsiblemente, los *films* de 70HA/30PEA mostraron una resistencia mayor en acetona, mientras que los de 30HA/70PEA, en agua. Los *films* de 50/50 sufrieron pérdidas importantes en ambos casos, hasta 50% de su peso seco inicial. Para confirmar el carácter de la degradación ocurrida, los restos de los *films* 50/50, después de su incubación en agua (_W) o en acetona (_A) fueron observados y sometidos a los ensayos de TGA y DSC, con el fin de aclarar su composición resultante. Las fotos de microscopía óptica (Figura 20) revelan la alteración estructural significativa sufrida por las muestras estudiadas, con los grandes huecos dejados tras la disolución de las fases correspondientes.

Los datos de TGA y DSC (Figura 21) revelan que los *films* 50/50 (y la relación másica actual HA/PEA = 53/47) tras la incubación en agua llegaron a la composición actual HA/PEA = 4/96, mostrando el comportamiento típico de PEA puro. Por otro lado, tras la incubación en acetona, la composición actual HA/PEA era 93/7, aunque las cantidades residuales de la fase PEA no eran suficientes para detectar su transición vítrea con DSC.

Se intentó reforzar los *blends* añadiendo los nanotubos de carbono (CNTs) a concentración de hasta 5 wt.% (respecto a la masa total de la matriz polimérica) a las soluciones de partida HA_FA y PEA_FA, y consiguiendo prolongar en este caso la estabilidad de los *blends* 50/50 en agua hasta 3-5 días. La inconveniente de este método estaba en que los CNTs en la solución polimérica mostraron cierta movilidad durante el proceso lento y largo de *solvent casting*, tendiendo a concentrarse en el área central y dejando las zonas periféricas libres de nanotubos, produciendo así las heterogeneidades inadmisibles.

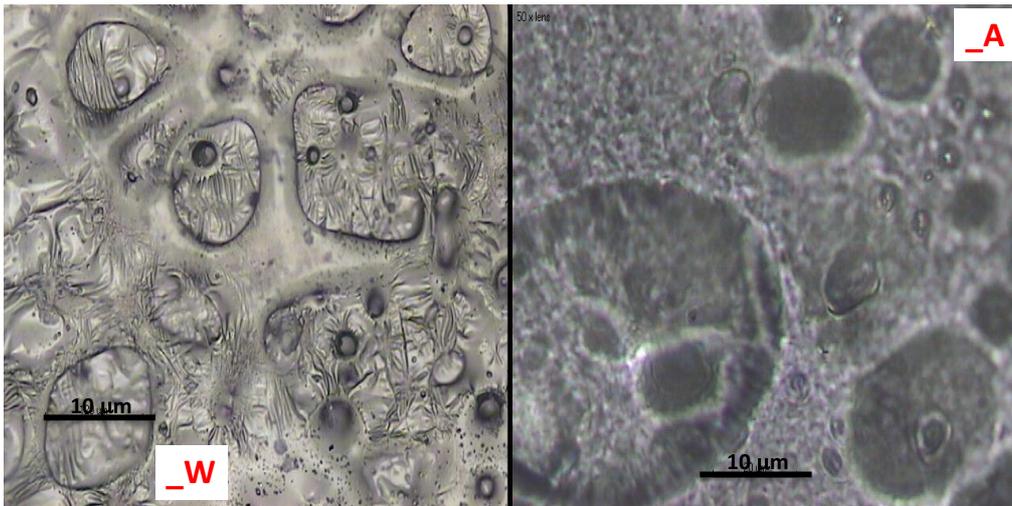


Figura 20. Fotos de microscopía óptica mostrando las alteraciones morfológicas del *film* 50HA/50PEA tras su degradación en agua (_W) o en acetona (_A).

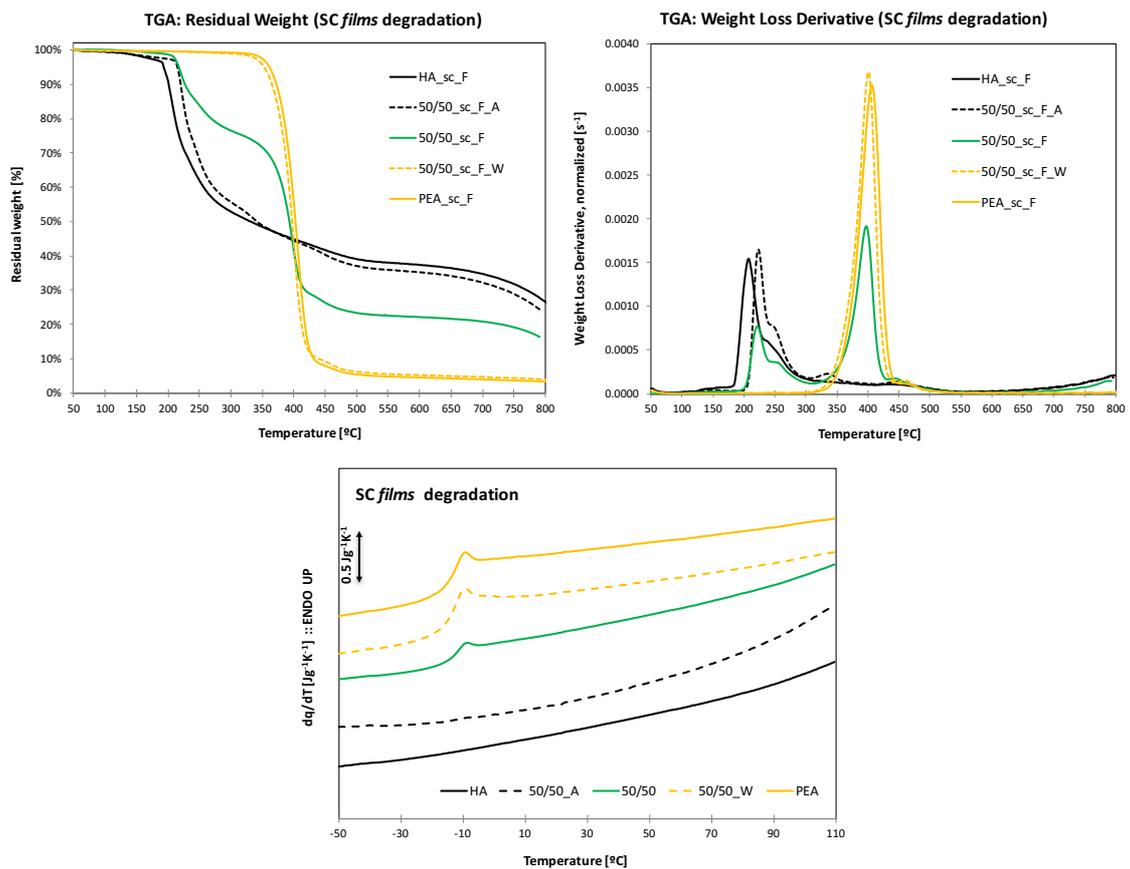


Figura 21. Termogramas de TGA (arriba) y de DSC (abajo) revelando los cambios en la composición y otras propiedades de los *films* 50/50 tras su degradación en agua (_W) y en acetona (_A).

Se decidió hacer un ensayo de citotoxicidad solo con los extractos de los sistemas combinados HA-PEA de la composición 70/30, 50/50 y 30/70, ya que los HA y PEA puros fueron caracterizados en el Capítulo 3. Durante la realización del ensayo se detectó una ligera acidificación del medio, con el cambio correspondiente de su coloración, revelando la presencia en los *films* de las cantidades residuales del ácido fórmico (probablemente, atrapadas por la fase HA con ayuda de puentes de hidrógeno) que no fueron eliminadas de todo en la etapa de extracción a vacío+40°C después de hacer el *solvent casting*. Su liberación en el medio de cultivo podría causar un efecto citotóxico sobre los fibroblastos; sin embargo, la viabilidad celular en los pocillos con los extractos de los sistemas evaluados solo se vio ligeramente afectada durante primeros 24h de cultivo, se mantuvo en general por encima del umbral de 70% respecto al blanco, y llegó a superar la del control negativo y el blanco a las 72h de cultivo (Figura 22).

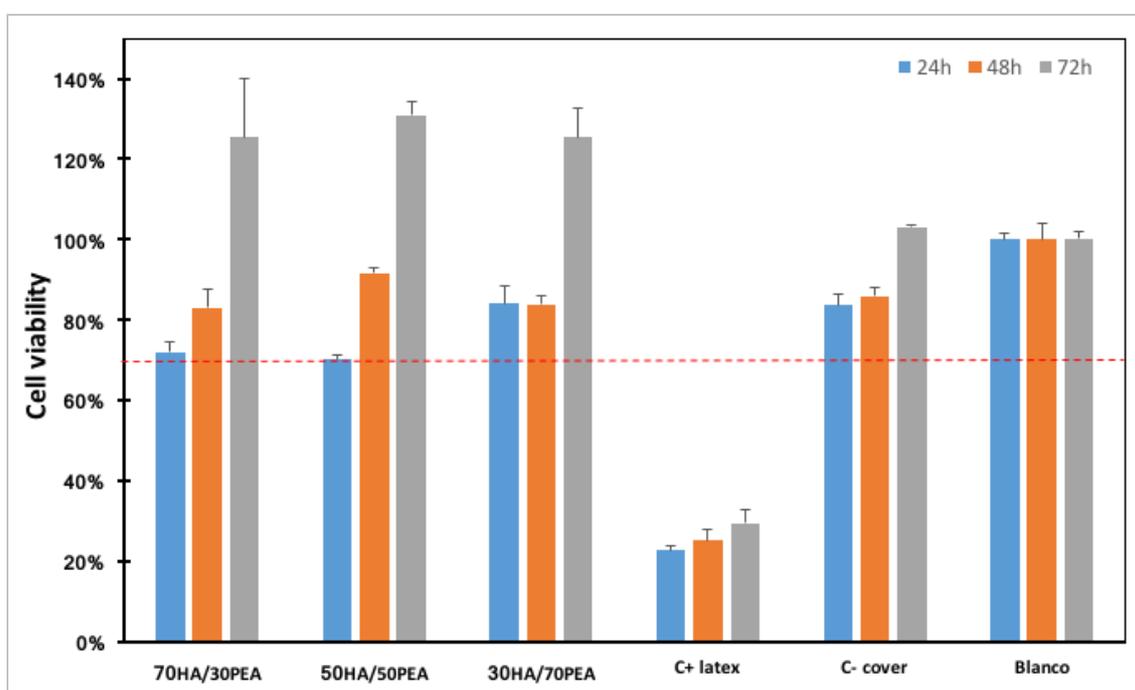


Figura 22. Viabilidad celular determinada en el ensayo de citotoxicidad con los extractos de los *films* HA-PEA, obtenidos vía *solvent casting*.

4.2.2. Producción y caracterización de las membranas hiladas de HA-PEA vía *electrospinning*.

Las primeras membranas hiladas fueron producidas vía *co-electrospinning*, utilizando un montaje simultáneo de 2 jeringas: una cargada con la solución 1 wt.% de HA_FA, y la otra, con la solución 4 wt.% de PEA_FA; sus contenidos se mezclaron justo antes de llegar a la aguja. Como cada jeringa fue propulsada por su propia máquina dispensadora, conociendo las concentraciones de las soluciones HA_FA y PEA_FA utilizadas, y regulando la velocidad de flujo en cada máquina, se podía producir membranas con una u otra relación másica entre ambos componentes. El estudio con SEM (Figura 23) reveló cierta heterogeneidad de las membranas que presentaron 2 tipos de fibras: las microfibras, de 1-3 μm de diámetro, distribuidas aleatoriamente y formando una densa red continua, entre las cuales aparecieron las nanofibras de <300 nm en diámetro, sin llegar a formar una red continua.

Pensando que el tiempo del que disponían las dos fases (entre su mezclado y su salida conjunta de la aguja en forma de *jet*) era insuficiente para formar una mezcla homogénea, se decidió cambiar la estrategia hacia un *electrospinning* convencional, utilizando una sola jeringa cargada con una mezcla anteriormente preparada de HA/PEA_FA, de la composición deseada y bien homogeneizada mediante agitación magnética. Por otro lado, se decidió subir la concentración de los dos polímeros en sus respectivas soluciones: hasta 2,5wt.% para HA_FA y hasta 5wt.% para PEA_FA, para conseguir una mayor consistencia de sus fibras. Aplicando estos cambios, fueron obtenidas membranas con fibras mucho más uniformes en aspecto, de 1-2 μm de diámetro (Figura 24, arriba), de la composición nominal esperada HA/PEA = 50/50 y 30/70, así como las membranas de HA y PEA puros, como control.

Los espectros de FTIR de las membranas 50/50 y 30/70 (Figura 25) confirman la presencia en ellos de todos los grupos característicos provenientes de HA y PEA y detectados en los films HA-PEA. Las termogramas de TGA, representadas en la Figura 26, indicaron que la relación másica HA/PEA en las membranas hiladas no se desviaba mucho de la nominal: 47/53 en el caso de 50/50 y 26/74 en el caso de 30/70. Además, las membranas seguían los perfiles de la degradación térmica bastante similares a los *films* de HA-PEA y determinados por su composición actual, aunque con un desplazamiento de todos los fenómenos a temperaturas ligeramente más altas.

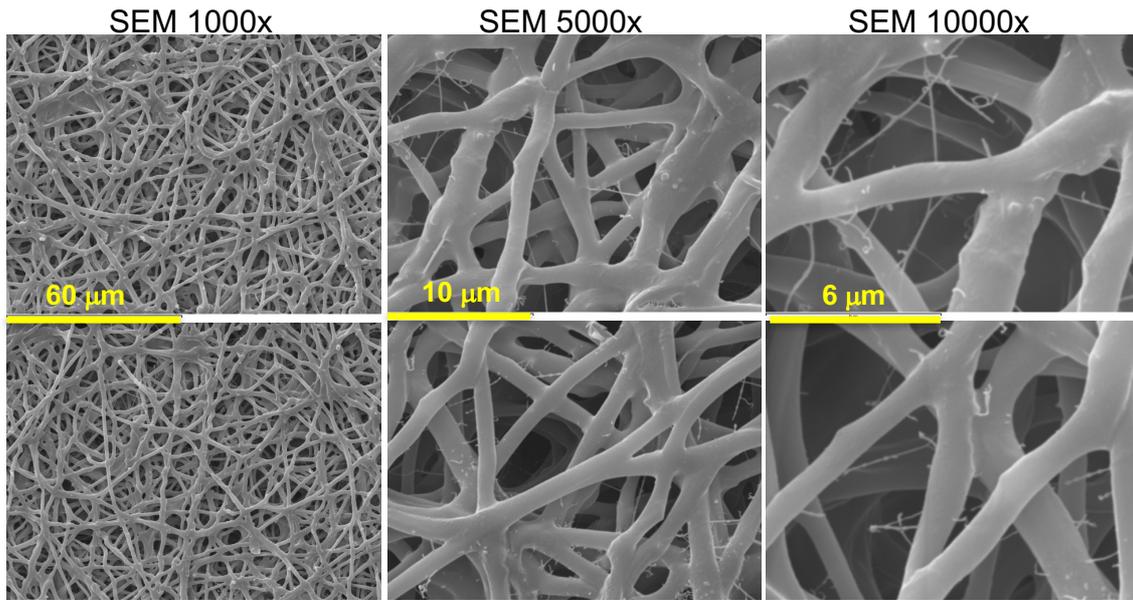


Figura 23. Imágenes SEM de membranas HA-PEA producidas vía co-electrospinning.

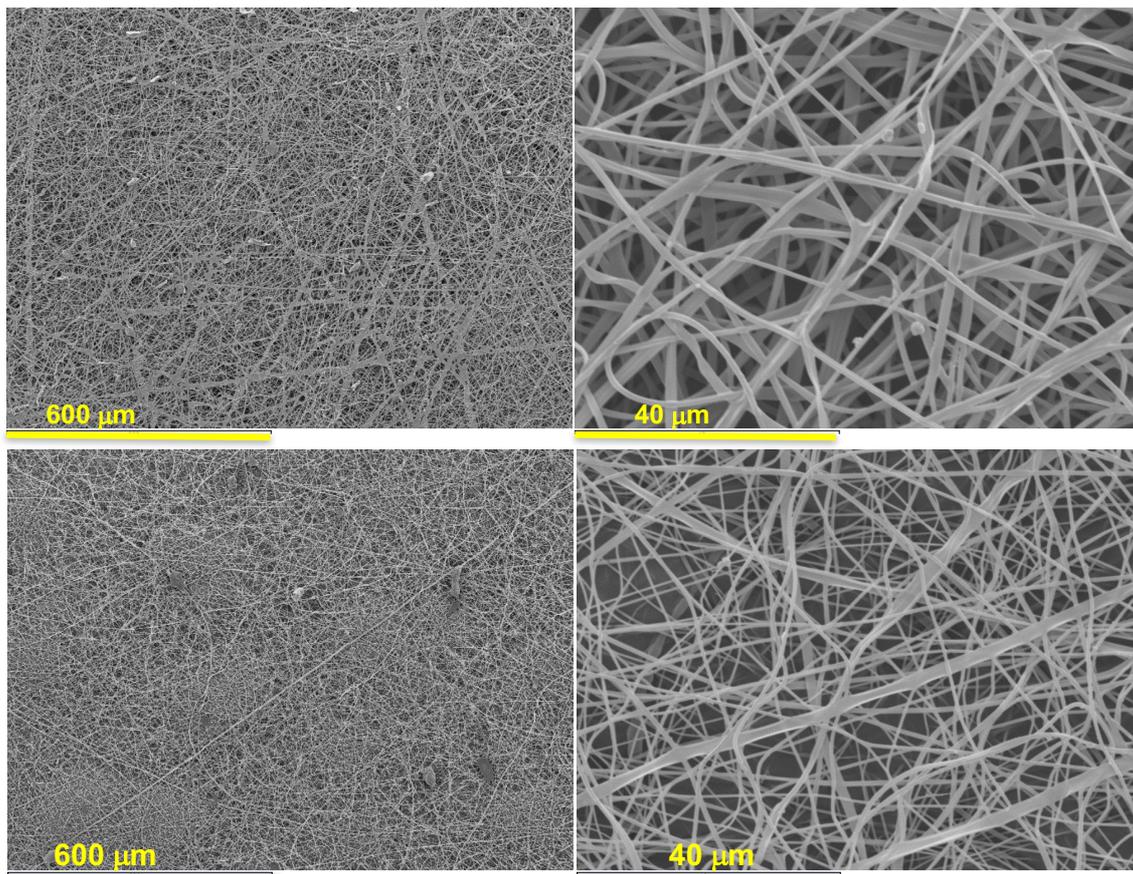


Figura 24. Imágenes de SEM de las membranas HA-PEA 50/50 producidas vía electrospinning convencional: sin nanotubos de carbono (arriba) y con nanotubos de carbono (abajo).

Dicho desplazamiento está más expresado para el perfil de HA que para PEA, lo que permite suponer que en estas fibras las fases HA y PEA:

(a) tienen mayor grado de compatibilidad debido a la rapidez del proceso del electrospinning que disminuye la separación de fases;

(b) se encuentran más interpenetradas, formando mayor número de *entanglements*, de tal manera que los restos de PEA impiden, constriñen o retrasan la difusión y escisión de los fragmentos de HA durante su degradación. Para aclararlo y determinar la estabilidad de las fases HA y PEA, se procedió a la incubación de las membranas 50/50 en agua (_W) o acetona (_A), de manera similar al hecho con los *films*. Efectivamente, se observó que las membranas hiladas tienen mayor resistencia tanto frente al agua, como frente al acetona, aunque también sucedió una disolución significativa de las fases de HA y PEA, correspondientemente. La composición actual de las membranas HA/PEA = 47/53 (nominal 50/50), se cambió a 73/27 tras la incubación en acetona y a 8/92 tras la incubación en agua, siendo detectada la presencia de ambas fases por TGA y DSC y, en general, manifestando mayor estabilidad de la fase PEA en comparación con la fase HA. El hinchamiento, la deformación y otros cambios morfológicos de las fibras, en comparación con el estado seco, se pueden observar en la Figura 27.

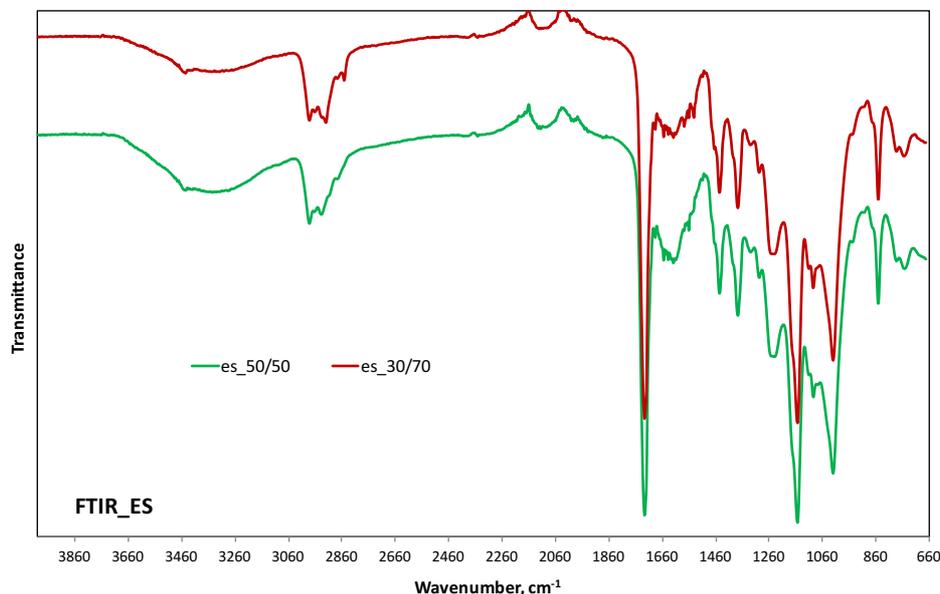
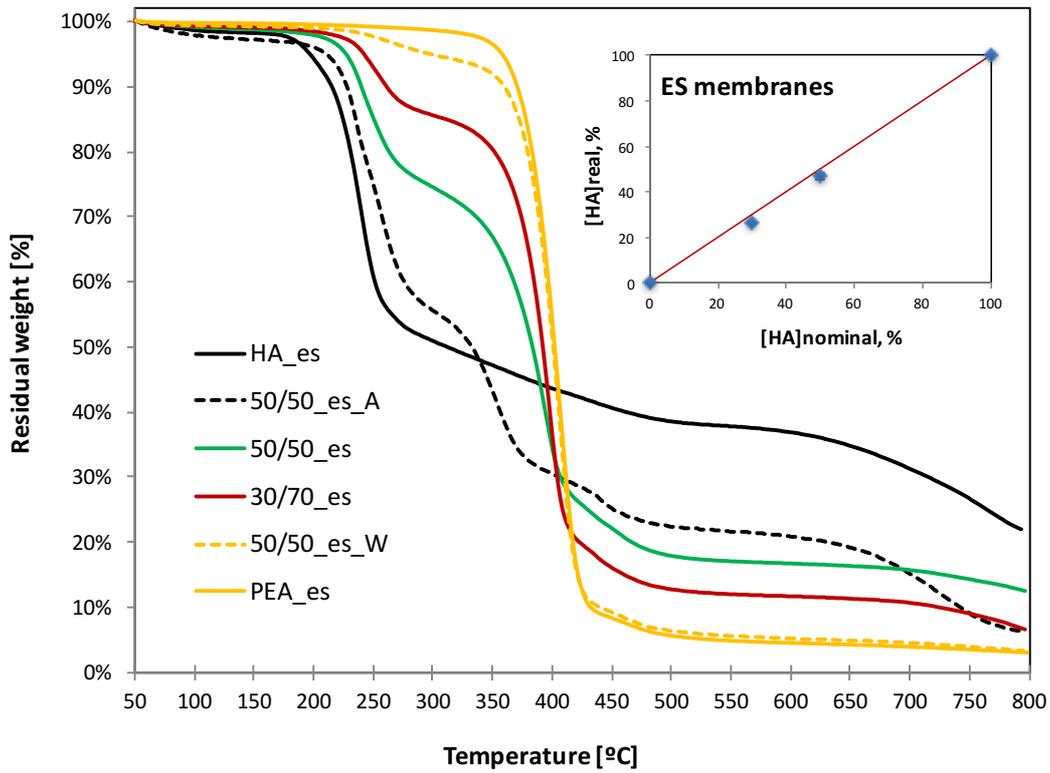


Figura 25. Espectros de FTIR de las membranas HA-PEA 50/50 y 30/70 producidas vía electrospinning convencional.

TGA: Residual Weight (ES membranes)



TGA: Weight Loss Derivative (ES membranes)

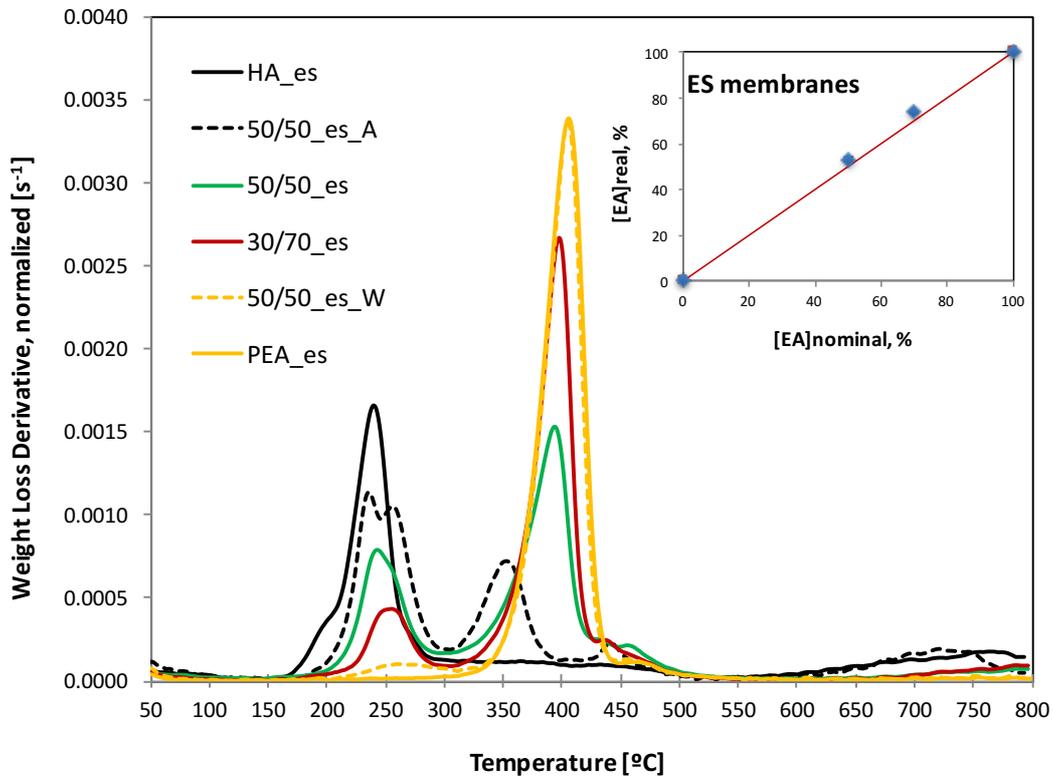


Figura 26. Termogramas de TGA de las membranas HA-PEA producidos vía electrospinning, así como de las membranas 50/50 tras su incubación en Agua (_W) o acetona (_A). Insertos: su composición actual frente a nominal.

En cuanto a las membranas híbridas, una gran incógnita era la distribución mutua de las fases HA y PEA: ¿se encontraban mezcladas en toda la continuidad de la fibra o segregadas de alguna manera? Intentando reforzar la estabilidad de las fibras en los disolventes, así como estudiar a mayor profundidad la interacción y la distribución de las fases HA y PEA, decidimos añadir los nanotubos de carbono (CNTs) a la mezcla 50/50 de HA/PEA_FA y probar realizar electrospinning con esta mezcla híbrida. Se comprobó que la concentración de nanotubos superior a 3wt.% causa obturación rápida de la aguja, por lo que se decidió limitarse a 1 wt.% de CNTs, respecto a la masa total polimérica. Las imágenes de SEM (Figura 24, abajo) exponen que la adición de CNTs ayuda a la orientación más ordenada y menos aleatoria de las fibras, que aparecen mejor alineadas y también más finas (0,5-1,5 μm de diámetro). Las imágenes de microscopía óptica (Figura 28) muestran, sin embargo, que los nanotubos no forman una fase continua, sino que se encuentran en forma de aglomerados dentro de las fibras. No obstante, su adición ayudó estabilizar ligeramente el sistema, ralentizando la disolución de la fase HA en agua (en cuestión de horas...días, en función de la concentración de CNTs en la matriz polimérica) y aumentando la resistencia de la fase PEA frente a acetona (Figura 28). También el hinchamiento de estas membranas en agua y acetona reveló que CNTs tienen una clara predilección por la fase HA, siendo su distribución más alterada después de la incubación en agua, disolviendo fase HA, que en acetona, disolviendo fase PEA (Figura 28). Debido a esto, el patrón de distribución de CNTs puede reflejar la distribución de la fase HA dentro de la fibra, asimismo sugiriendo que un fenómeno similar podría tener lugar en los *films* de *solvent casting*, caracterizados anteriormente.

Asimismo, se llevaron a cabo otros intentos de reforzar tanto los *films* de *solvent casting*, como las membranas de *electrospinning*, intentando entrecruzar la fase HA en el medio ácido con ayuda de DEO. Sin embargo, no se consiguió entrecruzar el ácido hialurónico suficiente para mantener su integridad en el agua durante un tiempo mayor de 3 días. La baja eficacia de DEO se debe a que el ácido fórmico, utilizado como disolvente para producir nuestros sistemas combinados, tiene los mismos grupos carboxilo ($-\text{COOH}$) que el ácido hialurónico y que son dianas para acción de DEO, por lo que FA, siendo el componente mayoritario, fácilmente compite con HA, reduciendo gravemente al rendimiento del proceso de entrecruzamiento.

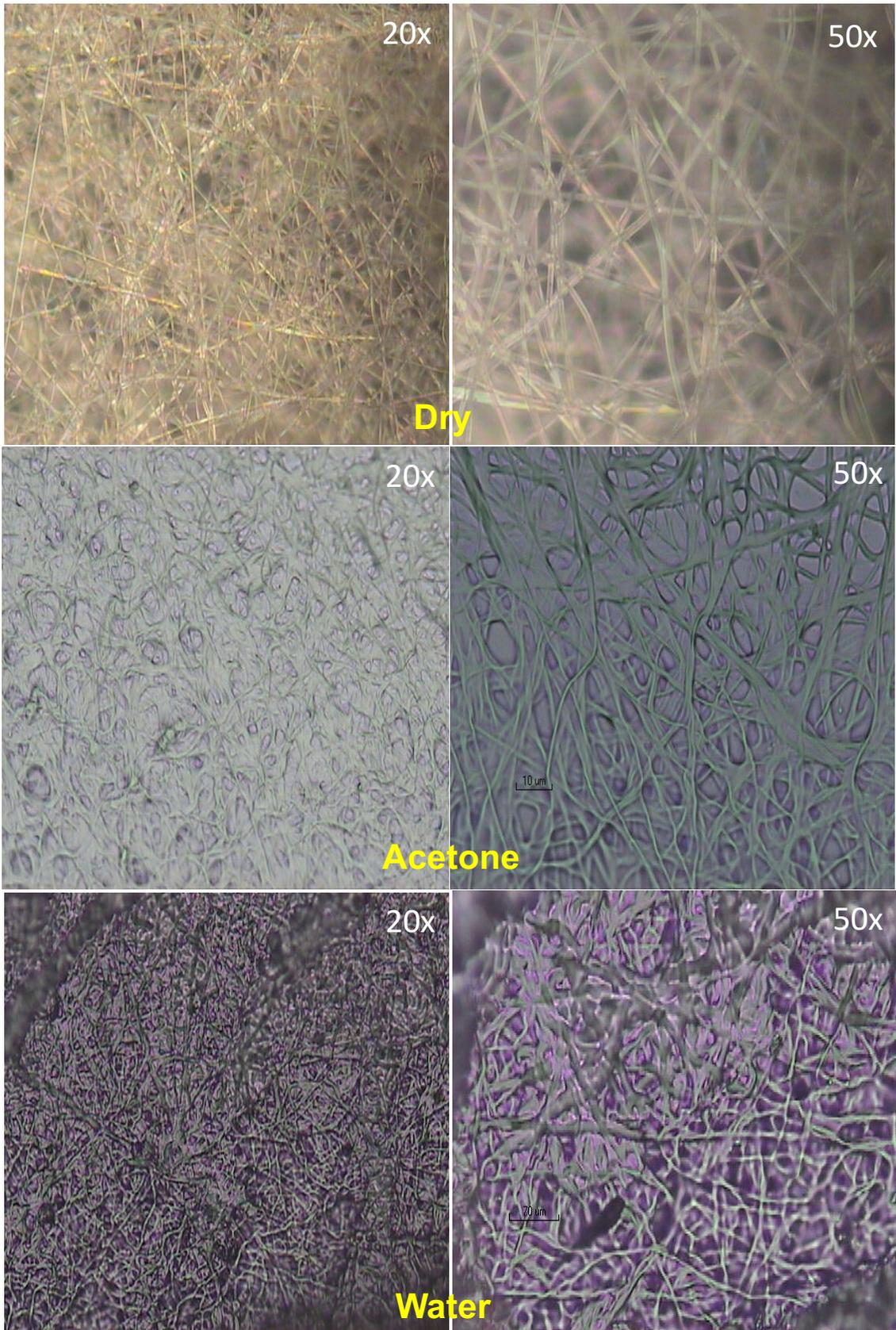


Figura 27. Imágenes de microscopía óptica de las membranas hiladas HA-PEA 50/50 sin nanotubos de carbono: en su estado seco original (arriba), tras su incubación en acetona (medio) y agua (abajo).

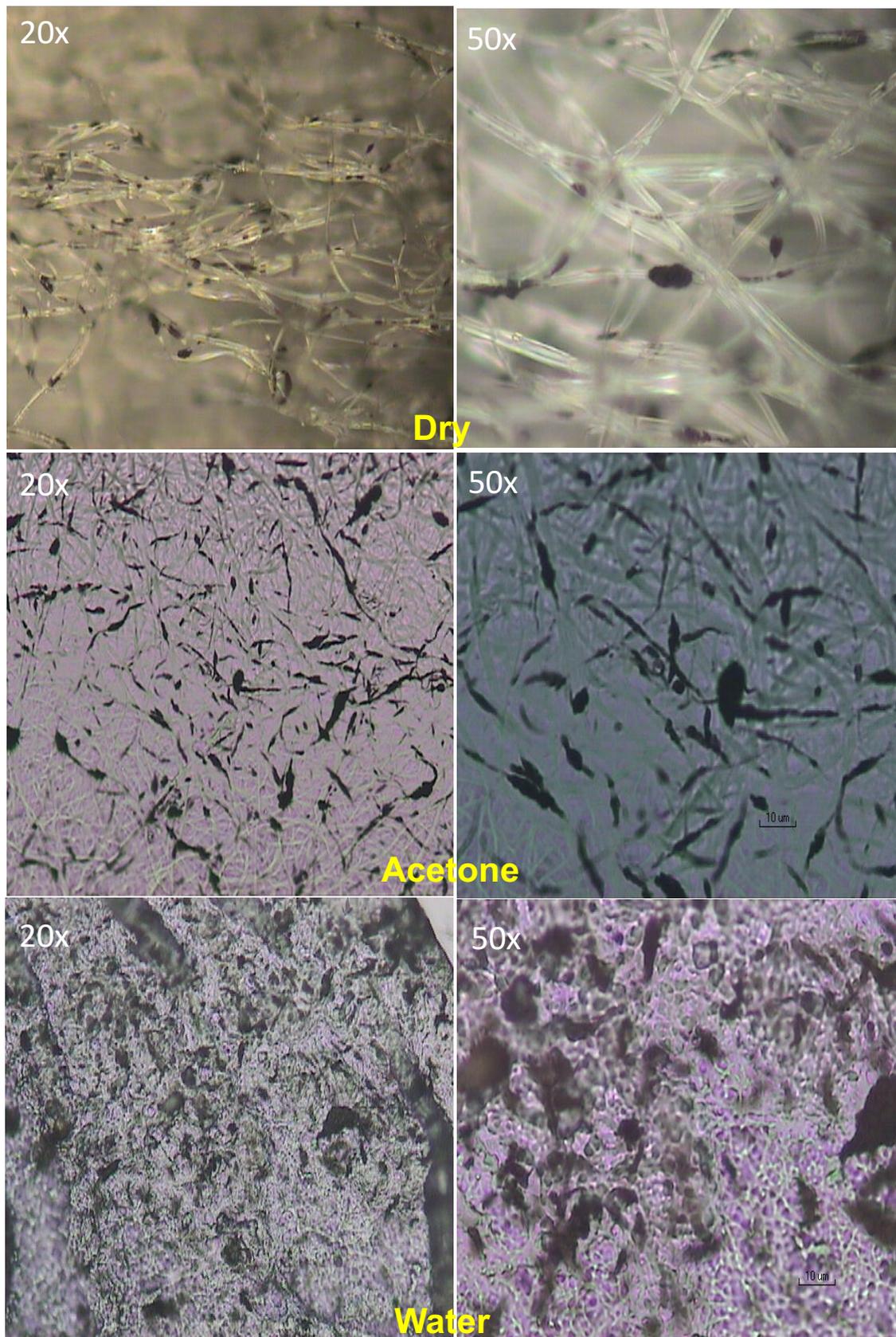


Figura 28. Imágenes de microscopía óptica de las membranas hiladas HA-PEA 50/50 con nanotubos de carbono: en su estado seco original (arriba), tras su incubación en acetona (medio) y agua (abajo).

4.2.3. Producción de los *scaffolds* tridimensionales de HA-PEA vía *freeze-extraction*.

Aprovechando que la temperatura de congelación del ácido fórmico es bastante alta ($\approx 8^{\circ}\text{C}$), se decidió probar producir los *scaffolds* mediante *freeze-extraction*, consistiendo en congelación instantánea de HA_FA, PEA_FA y sus respectivas mezclas, eliminando el FA residual con varios lavados en isopropanol a $T = -18^{\circ}\text{C}$ y la liofilización posterior. Las imágenes de SEM de los *scaffolds* fabricados se representan en la Figura 29, mostrando una estructura microporosa con tamaño de poros entre 1 y 30 μm . Se observó que la adición de CNTs a HA_FA mejoró la porosidad de su correspondiente *scaffold*. Igual que en el caso de electrospinning, los nanotubos de carbono tampoco formaron una fase continua, formando agregados dentro del tejido polimérico. El scaffold fabricado del PEA puro tenía deficiente microporosidad, propiedades mecánicas insuficientes y un aspecto fundido, mientras que el producido a partir de la mezcla 50/50 se caracterizaba con buena estructura y microporosidad, combinando las ventajas de los dos polímeros.

Sin embargo, todos los *scaffolds* producidos con HA, se deshacían en un medio acuoso en el tiempo relativamente corto (1-2 días), y la adición de CNTs, aunque tuvo en efecto reforzante general sobre las propiedades de *scaffolds*, solo ralentizaba ese proceso. Además, no se pudo encontrar un porógeno adecuado para adquirir a los *scaffolds* la macroporosidad deseada y la estructura de poros interconectados necesaria para sus aplicaciones en la Ingeniería Tisular. El problema principal consistía en que todos los porógenos probados (microesferas de PEMA, PMMA, azúcar *glass*, etc.) se disolvían en el ácido fórmico, no pudiendo cumplir su función de porógeno *a priori*.

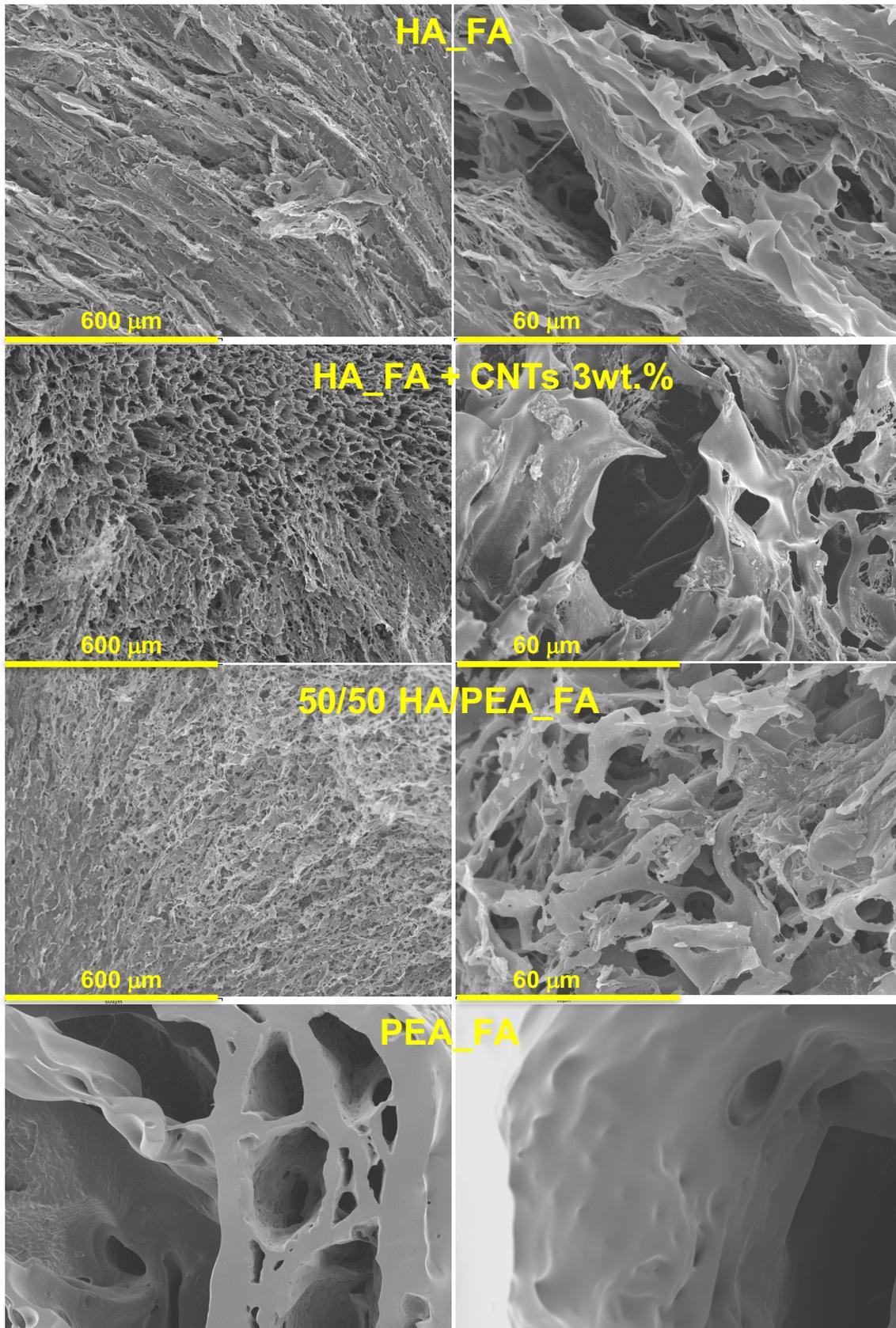


Figura 29. Imágenes de SEM de los scaffolds producidos vía freeze-extraction de HA_FA, PEA_FA y su mezcla 50/50.

4.2.4. Producción de redes poliméricas semi-interpenetradas (*semi-IPNs*) de HA-PEA mediante hibridación acoplada al hinchamiento.

A pesar de buen hinchamiento conseguido por los discos de PEA_X en la solución HA_FA, con la absorción de las moléculas de HA dentro de la red hinchada de PEA, después de incubar esos discos en acetona, con el fin de causar su deshinchamiento gradual con la condensación del HA atrapado en el tejido del PEA_X, no se consiguió la retención deseada del ácido hialurónico por el PEA. Los datos de FTIR y TGA no revelaron alguna presencia significativa del HA en los discos secos, por lo que esta opción fue descartada como poco viable para producir las *semi-IPNs* que se pretendían.

4.3. CONCLUSIONES PARCIALES

Las soluciones de HA y PEA en ácido fórmico son completamente compatibles y miscibles en amplio rango de concentraciones, produciendo unas mezclas transparentes y manejables. En los *films* obtenidos mediante *solvent casting* de esas mezclas, la fase HA proporciona rigidez y propiedades vítreas al sistema y mantiene su continuidad incluso cuando su contenido es relativamente bajo (30/70). La fase PEA proporciona flexibilidad y propiedades gomosas al sistema y también se manifiesta como la fase continua. Sin embargo, la lentitud y longitud del proceso de *solvent casting* causa la separación parcial de las fases y aparición de heterogeneidades en la mezcla.

La acción conjunta de vacío y calentamiento hasta 40°C no es suficiente para eliminar toda la cantidad del FA retenida por la matriz polimérica durante el proceso de *solvent casting*. No obstante, los materiales no son citotóxicos, y sus extractos manifiestan buena viabilidad celular tras 72 horas de cultivo con fibroblastos.

Por otro lado, las dos fases, al no ser entrecruzados, se manifiestan vulnerables frente a sus respectivos disolventes (por ejemplo, agua para HA y acetona para PEA), lo que limita su procesabilidad y manipulabilidad en el laboratorio y, en caso de HA, impide algunas aplicaciones que requieran un biomaterial estable a largo plazo.

Las mezclas HA-PEA_FA se mostraron totalmente electrospinnables, tanto en sistemas de co-electrospinning, como en electrospinning convencional. Las membranas hiladas obtenidas a su base manifiestan mayor resistencia frente al agua y acetona, que los respectivos *films* bidimensionales, pero la fase HA todavía necesita un refuerzo adicional.

La adición de nanotubos de carbono mejora el aspecto de las membranas de electrospinning en cuanto a la orientación, alineamiento y diámetro de las fibras. Los CNTs se distribuyen preferentemente por la fase HA, y llegan a estabilizar el sistema ralentizando la disolución de la fase HA en agua y la fase PEA en acetona. En general, el efecto reforzante de nanotubos está más expresado en las membranas hiladas que en los *films*.

Se han producido los *scaffolds* tridimensionales microporosos a partir de las mezclas HA-PEA vía *freeze-extraction*. Sin embargo, no se pudo conseguir una macroporosidad deseada ni estructura de poros interconectados, por no poder encontrar un porógeno adecuado que no se

disuelva en el ácido fórmico. Además, los scaffolds obtenidos “heredaron” los problemas ya comentados provenientes del carácter no entrecruzado de las fases HA y PEA.

No se consiguió entrecruzar el HA con ayuda de DEO por su interacción con el ácido fórmico que, poseyendo los mismos grupos diana que el HA (los carboxilos $-\text{COOH}$), compite con HA como sustrato para DEO. Por otro lado, no hay ninguna manera de entrecruzar PEA ni combinarla químicamente con HA: PEA carece de potencial químico para esto, ya que su monómero, EA, no tiene ningún grupo funcional (como hidroxilo, $-\text{OH}$, carboxilo, $-\text{COOH}$ o amino, $-\text{NH}_2$) que pueda ser aprovechado para reticularlo consigo mismo o con HA. Lo mismo se refiere a los intentos fracasados de producir las *semi-IPNs* a base de PEA_X hinchada y solución HA_FA, resultando en la no retención del HA en las redes de PEA entrecruzada.

Una solución para combinar el HA y PEA de manera estable podría consistir en proporcionar al PEA los grupos reactivos necesarios copolimerizando EA con otro monómero acrílico que no altere demasiado las buenas propiedades de PEA como para servir de biomaterial.

No obstante, los sistemas producidos en este Capítulo son aptos para las aplicaciones que necesitan de un biomaterial semidegradable. Asimismo, ellos pueden tener todas las aplicaciones que tiene PEA por sí, además poseyendo cierta hidrofiliidad y, aunque se degradan considerablemente en un medio acuoso, lo hacen liberando el ácido hialurónico y sus fragmentos, con buenas propiedades angiogénicas y elevada biocompatibilidad para muchos tipos de células.

CAPÍTULO 5. SISTEMAS COPOLIMÉRICOS P(EA-co-CEA)

5.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se planteó producir cuatro tipos de materiales, caracterizarlos y evaluar la posibilidad de su aplicación en el ámbito de Ingeniería Tisular:

- Homopolímeros PEA y PCEA, no entrecruzados,
- Copolímeros P(EA-co-CEA), no entrecruzados,
- Homopolímeros PEA y PCEA, entrecruzados,
- Copolímeros P(EA-co-CEA), entrecruzados.

En principio, se trataba de conseguir sistemas viables compatibilizando las unidades de EA (como componente mayoritario) con las unidades de CEA (como componente minoritario), pretendiendo aprovechar de los grupos funcionales, hidrofiliidad y reactividad que se espera obtener de las últimas. También se espera que los sistemas copoliméricos P(EA-co-CEA) van a ser más biodegradables que el PEA puro, que potenciará su aptitud como biomateriales para ingeniería tisular.

Como los sistemas copoliméricos arriba mencionados son materiales relativamente novedosos, se requieren llevar a cabo un estudio a fondo, caracterizando sus propiedades físico-químicas y mecánicas, su composición y estructura de fase, estabilidad y manipulabilidad, así como su biocompatibilidad.

Al final, en base de los resultados conseguidos en los ensayos de caracterización, se deben determinar los candidatos que sean mejores que PEA puro, para producir los sistemas combinados con el Ácido Hialurónico, ya sea en forma de *films* de *Solvent Casting*, membranas hiladas de *Electrospinning*, *scaffolds* tridimensionales de *Freeze-extraction* o redes poliméricas *semi-interpenetradas* (semi-IPN).

5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.2.1. Síntesis de sistemas poliméricos

El reactivo de CEA elegido para la producción de sistemas copoliméricos con PEA fue en realidad una mezcla heterogénea de oligómeros (Figura 30), por lo que cabe esperar cierta variabilidad en la estructura química y geometría molecular de los homo- y copolímeros resultantes. Eso, junto con el fuerte carácter polar, alta hidrofiliicidad y la abundancia de los grupos carboxilo ($-\text{COOH}$) expuestos por CEA, es de enorme interés considerando el potencial de su anclaje con las moléculas de HA. Además, la presencia de las unidades del ácido acrílico debe conferir al sistema una alta reactividad característica para este monómero [48].

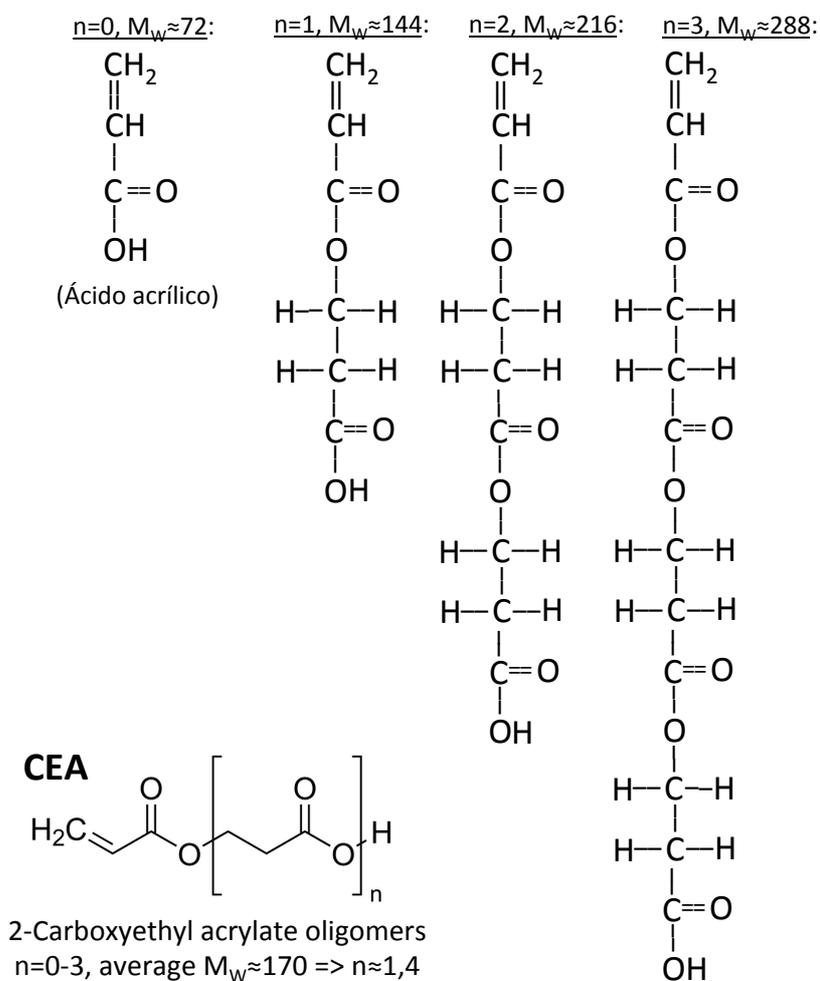


Figura 30. Estructura variable de CEA.

Primero, se estudió la reactividad de EA y CEA por separado, se determinaron las condiciones óptimas de su polimerización y, en base de esto, se produjeron y se caracterizaron sus respectivos homopolímeros, PEA y PCEA, tanto entrecruzados como no entrecruzados. Posteriormente, se hicieron pruebas preliminares de copolimerización de los dos comonómeros, pretendiendo conseguir un copolímero funcional, uniforme de estructura y con una distribución homogénea de propiedades, derivadas de la propia combinación de los co-monómeros. Primera combinación probada era $m_{EA}:m_{CEA} = 90:10$, con y sin entrecruzar, y luego se extendió a producir una serie de copolímeros de composición nominal 90/10, 80/20, 70/30 y 60/40 (Tabla 5). La relación molar entre las unidades de EA, n_{EA} , respecto al número de unidades de CEA, n_{CEA} en los copolímeros se determinó mediante cálculos estequiométricos según la ecuación 8:

$$\frac{n_{EA}}{n_{CEA}} = \frac{X_{EA}}{X_{CEA}} \cdot \frac{M_{CEA}}{M_{EA}} \quad (8),$$

donde X_{EA} y X_{CEA} son las fracciones másicas de los monómeros, y M_{EA} y M_{CEA} , sus respectivos pesos moleculares.

Las pruebas preliminares realizadas mediante una polimerización rápida vía RedOx de EA y CEA mostraron que los dos monómeros tienen reactividad muy diferente. Mientras que EA tardaba 5 minutos en comenzar a polimerizarse y otros 2 minutos para completar la reacción, CEA empezaba a reaccionar inmediatamente tras añadir el catalizador (DMpT) y necesitaba 1.5 minutos para completar la reacción. En el caso del copolímero de la proporción másica EA/CEA = 90/10, la reacción tardaba 2.5 minutos en empezarse y se completó en aproximadamente 2 minutos, dando lugar a un producto irregular, aparentemente heterogéneo, con uniformidad deficiente confirmada con los ensayos de DSC, TGA y pruebas rápidas de hinchamiento/solubilidad en acetona y en agua. Los resultados parecidos posteriormente fueron obtenidos en la fotopolimerización, donde la mezcla reactiva, tras previa agitación, se incubaba en una estufa UV hasta 12 horas. En estas condiciones, la mayor reactividad que tenía CEA frente a EA, causaba que las moléculas de CEA se activaron primeros y empezaron a polimerizarse entre si antes de que las moléculas de EA se activaron lo suficientemente, llevando a la producción de una mezcla de dos homopolímeros o un “copolímero en bloques”, con unidades de EA y CEA agrupadas en grandes dominios. Sin embargo, nuestro objetivo requería la producción de un copolímero regular y homogéneo, que debería ser un “copolímero al azar”, con la distribución aleatoria de los dos tipos de unidades repetitivas y, entonces, con un adecuado grado de uniformidad

de sus propiedades físico-químicas en cualquier punto del material. Para esto, sería necesario poder sincronizar las dos reacciones de polimerización y como solución se probó un pretratamiento del componente menos reactivo, EA, mediante su incubación (previamente añadida la cantidad correspondiente del fotoiniciador) en la estufa UV durante 1 hora antes de añadir CEA (y su cantidad proporcional de fotoiniciador) a la mezcla reactiva. Este tiempo de incubación fue determinado como el tiempo razonable, suficiente para que se active el fotoiniciador, pero sin que empiece a producirse PEA pura. La uniformidad deseada de un copolímero poly(EA-co-CEA) de relación másica 90/10 (Figura 31) producido de esta manera fue comprobada con ensayos previamente mencionados y dicho pretratamiento se utilizó en todas polimerizaciones posteriores, para producir copolímeros tanto no entrecruzados, como entrecruzados. Una vez establecido el protocolo definitivo de la copolimerización, se produjeron los homo- y copolímeros de composición indicada en la Tabla 5. Los materiales producidos eran los films transparentes, de 5-6 gramos de peso. Al final, se obtuvo una colección de materiales, tanto entrecruzados (**_X**) como no entrecruzados (**_noX**), con la composición nominal y relación molar entre sus unidades monoméricas presentadas en la Tabla 5.

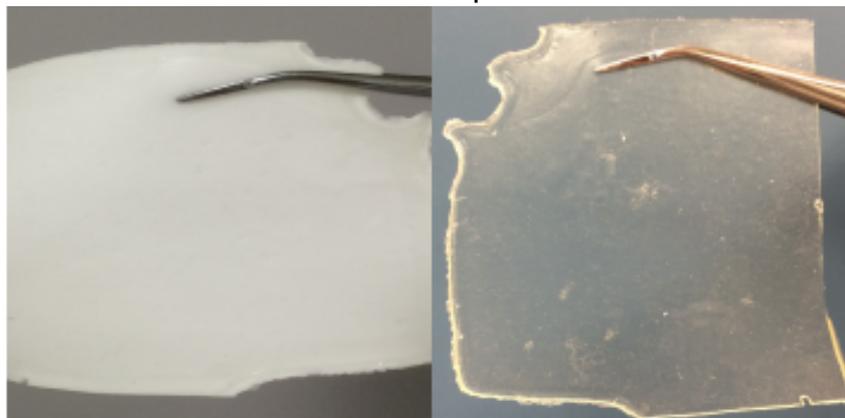


Figura 31. El aspecto definitivo del copolímero 90/10 no entrecruzado, después del lavado (izquierda) y de secado (derecha).

Tabla 5. Composición nominal de los homo- y copolímeros producidos.

| Materiales | Contenido Nominal | | | | | | M_n |
|------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|-------|
| | $[EA]_{\text{nominal}}$, % | $[CEA]_{\text{nominal}}$, % | X_{nominal} (EA) | X_{nominal} (CEA) | n_{EA} / n_{CEA} | n_{CEA} / n_{EA} | |
| PEA | 100 | 0 | 1.0 | 0.0 | - | 0.00 | 100 |
| 90/10 | 90 | 10 | 0.9 | 0.1 | 15.30 | 0.07 | 111 |
| 80/20 | 80 | 20 | 0.8 | 0.2 | 6.80 | 0.15 | 125 |
| 70/30 | 70 | 30 | 0.7 | 0.3 | 3.97 | 0.25 | 143 |
| 60/40 | 60 | 40 | 0.6 | 0.4 | 2.55 | 0.39 | 167 |
| PCEA | 0 | 100 | 0.0 | 1.0 | 0.00 | - | 170 |

Una vez producida la colección completa de homo- y copolímeros entrecruzados y no entrecruzados, de composición nominal indicada arriba, se procedió a determinar la composición real, caracterizar las propiedades físico-químicas así como la biocompatibilidad de estos materiales. En esta sección se va a comparar los parámetros de los materiales respecto a su contenido en CEA, empleando los métodos de caracterización explicados en Materiales y Métodos.

5.2.2. Caracterización físico-química de los materiales producidos

Primer ensayo empleado para determinar la composición de los sistemas copoliméricos producidos fue FTIR, cuyos resultados están expuestos en la Figura 32.

Los correspondientes homopolímeros fueron utilizados como materiales control. Se detectan los picos representativos en todos los espectros. El más llamativo se encuentra en la zona bastante ancha, entre 3100 y 3600 cm^{-1} , lo que corresponde a los grupos $-\text{OH}$ formando parte de los grupos carboxilo ($-\text{COOH}$) aportados al sistema con unidades de CEA. Y, efectivamente, se observa una clara tendencia de correlación directa (aumento) de la intensidad de la señal con el contenido de CEA, para este rango de números de onda. Otro pico característico se sitúa entre aproximadamente 2900 y 3000 cm^{-1} y corresponde a los grupos metilo ($-\text{CH}_3$) aportados con las unidades de EA. En este caso, su correlación con el contenido de CEA es inversa, reflejando la disminución de la proporción de EA en el sistema. Alrededor de 1700 cm^{-1} en todos los materiales aparece un pico muy abundante que corresponde al grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) presente tanto en EA como en CEA. A partir de 1400 cm^{-1} se encuentran zonas de huellas de diferentes grupos funcionales, por ejemplo, la del grupo éster entre 1000 cm^{-1} y los 1300 cm^{-1} , presente en ambos co-monómeros. Cabe destacar que los materiales entrecruzados no presentan ningún pico característico que esté ausente en los no entrecruzados, ya que el agente entrecruzador empleado (EGDMA) no introduce grupos funcionales nuevos que no estén presentes en EA/CEA.

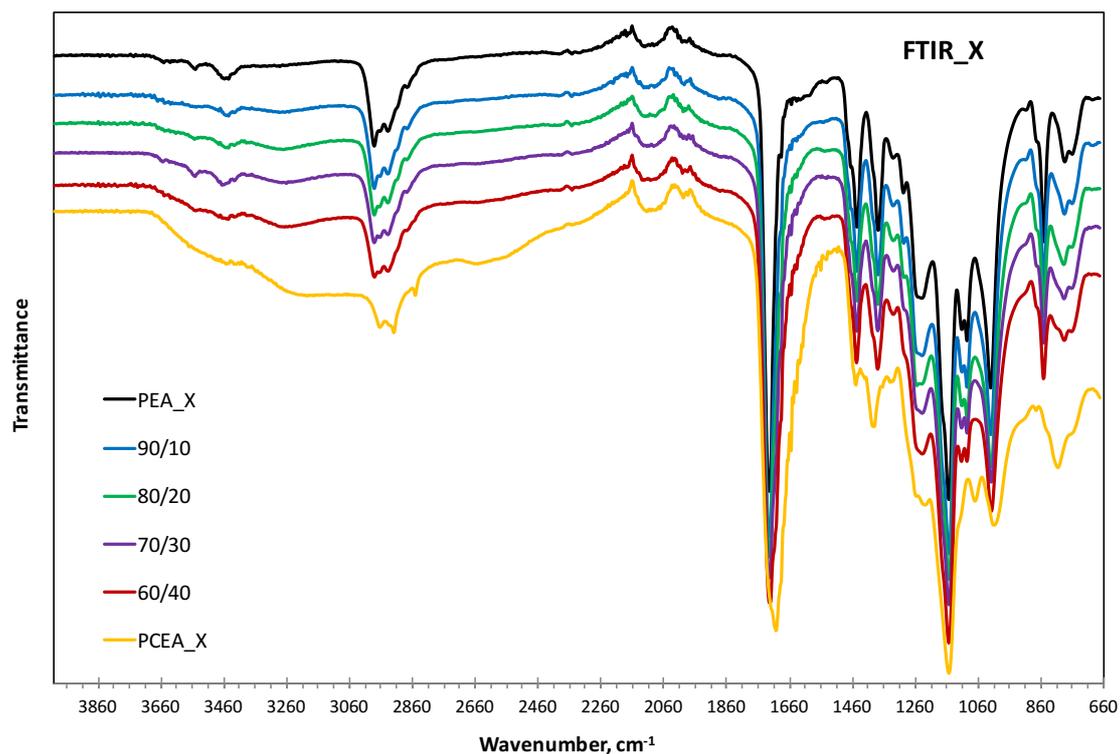
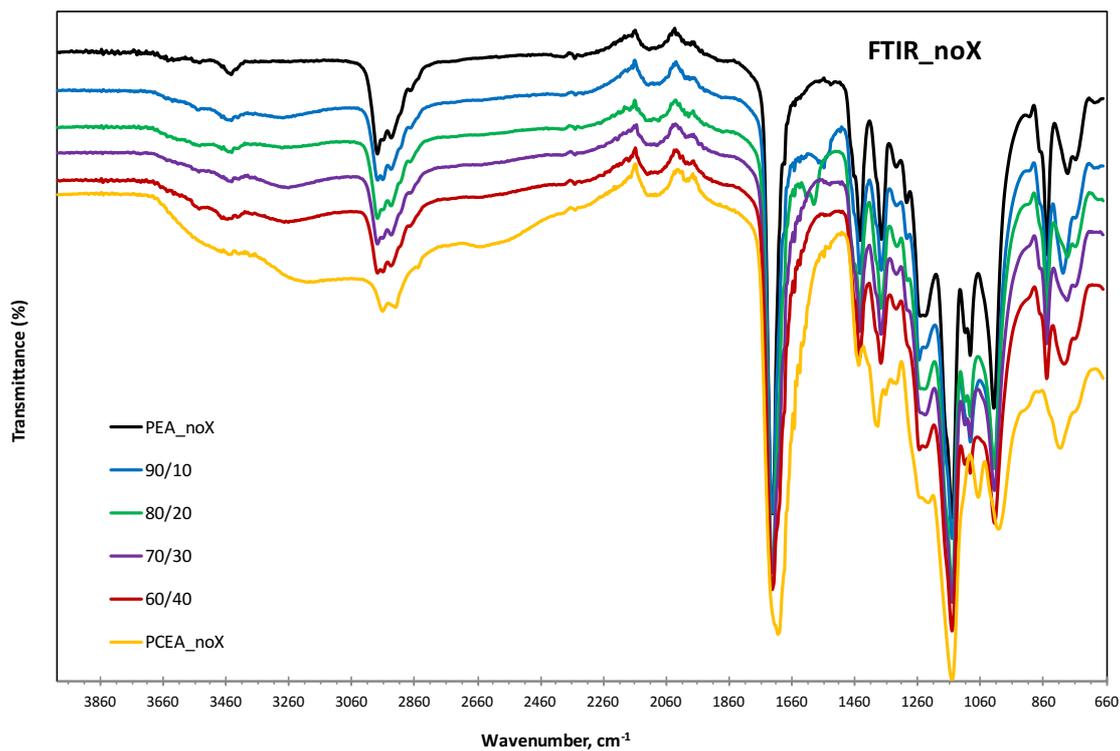


Figura 32. Espectros de FTIR para los sistemas no entrecruzados (arriba) y entrecruzados (abajo).

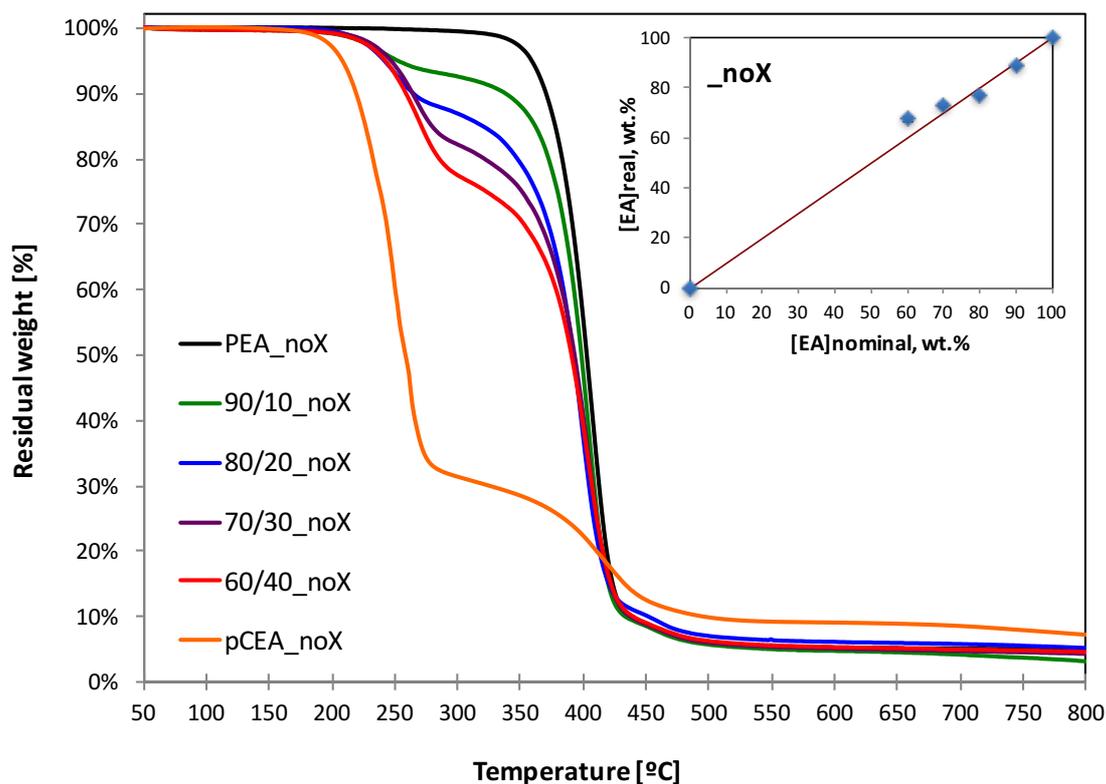
Las termogramas de la masa residual y de la derivada de la pérdida de masa, ambas respecto a temperatura, están representadas en la Figura 33 (para los sistemas no entrecruzados) y en la Figura 34 (para los sistemas

entrecruzados). A diferencia de la masa residual en función de temperatura, la derivada de pérdida de masa no aporta alguna nueva información esencial, pero ayuda a visualizar el carácter de la degradación térmica de los materiales, marcando claramente los picos de la degradación principal (cuya área corresponde a la masa perdida en un rango dado de temperaturas).

Los homopolímeros no entrecruzados muestran perfiles de la degradación térmica bien diferentes. En caso de PEA no entrecruzada, dicha degradación es muy sencilla y se realiza en dos etapas: una predominante (más de 90% de la pérdida total de masa), que tiene lugar entre 315 y 445°C, inmediatamente seguido por la otra, muy reducida (menos de 3% de la pérdida total de masa), parcialmente superpuesta con el anterior, que se completa después de 500°C. La degradación térmica de PCEA no entrecruzada tiene perfil más complejo y consiste de dos etapas bien separadas: la primera, mayoritaria (hasta 70% de la pérdida total de masa), sucede entre 170 y 290°C, y la segunda, minoritaria (más de 20% de la pérdida total de masa), ocurre entre 335 y 525°C, siendo particularmente parecida al 2º pico de la degradación de PEA. Los copolímeros no entrecruzados manifiestan un comportamiento combinado (con superposición parcial de los picos), exhibiendo perfiles intermedios de la degradación, en total de tres etapas, y reflejando una buena correlación entre la intensidad de cada pérdida de masa y el contenido actual de EA/CEA. Además, en los sistemas copoliméricos se detecta la influencia mutua entre sus dos componentes, en forma de un ligero desplazamiento de los picos a temperatura más alta o más baja comparando con los picos correspondientes a homopolímeros.

En cuanto a los sistemas entrecruzados, su degradación térmica muestra ciertas diferencias respecto a los no entrecruzados. Por ejemplo, la degradación de PEA entrecruzada tiene lugar entre 330 y 510°C, en una sola etapa, resultando en ≈94% de la pérdida total de masa. La degradación térmica de PCEA entrecruzada se ve desplazada a temperaturas significativamente mayores: la primera etapa ocurre entre 190 y 320°C (implicando más de 60% de la pérdida total de masa) y la segunda etapa ocurre entre 330 y 520°C (≈30% de la pérdida total de masa). Los copolímeros entrecruzados, a su vez, manifiestan un comportamiento intermedio, reflejando su composición actual en los perfiles de la degradación que siguen. Se observan las mismas tendencias en cuanto a ligeros desplazamientos de las temperaturas de inicio, máximo y fin de cada etapa por la influencia mutua de los dominios de PEA y CEA en copolímeros entrecruzados.

TGA: Residual Weight (non-crosslinked)



TGA: Weight Loss Derivative (non-crosslinked)

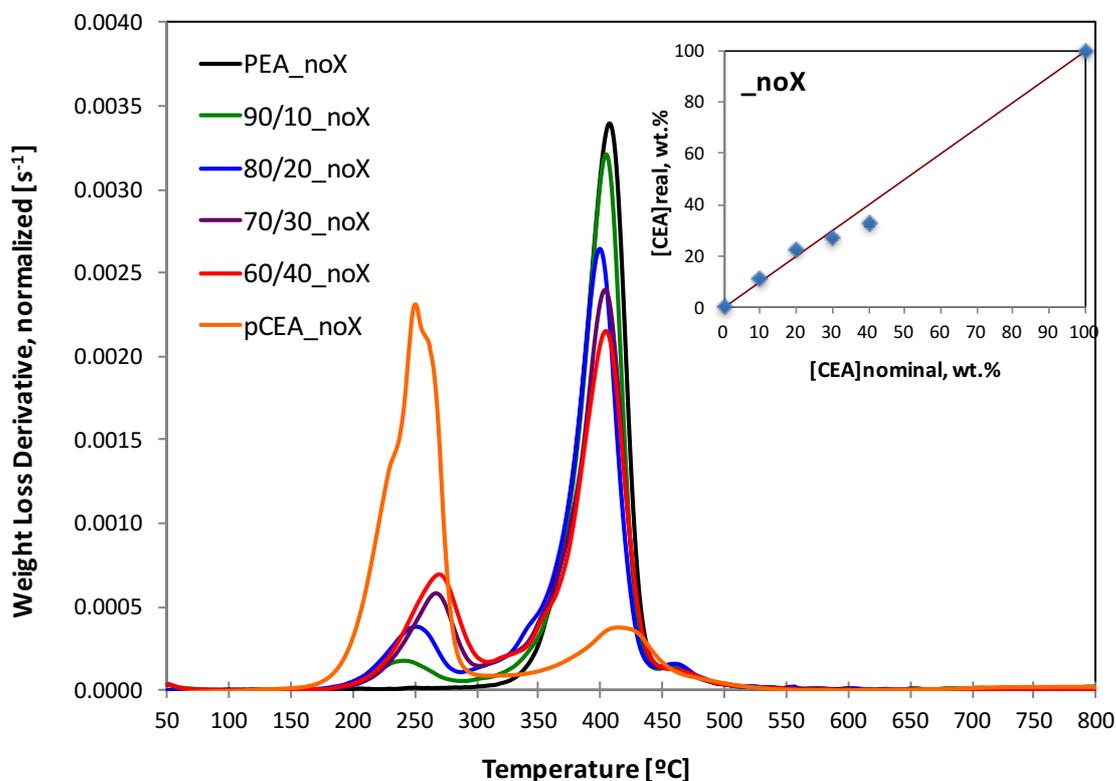
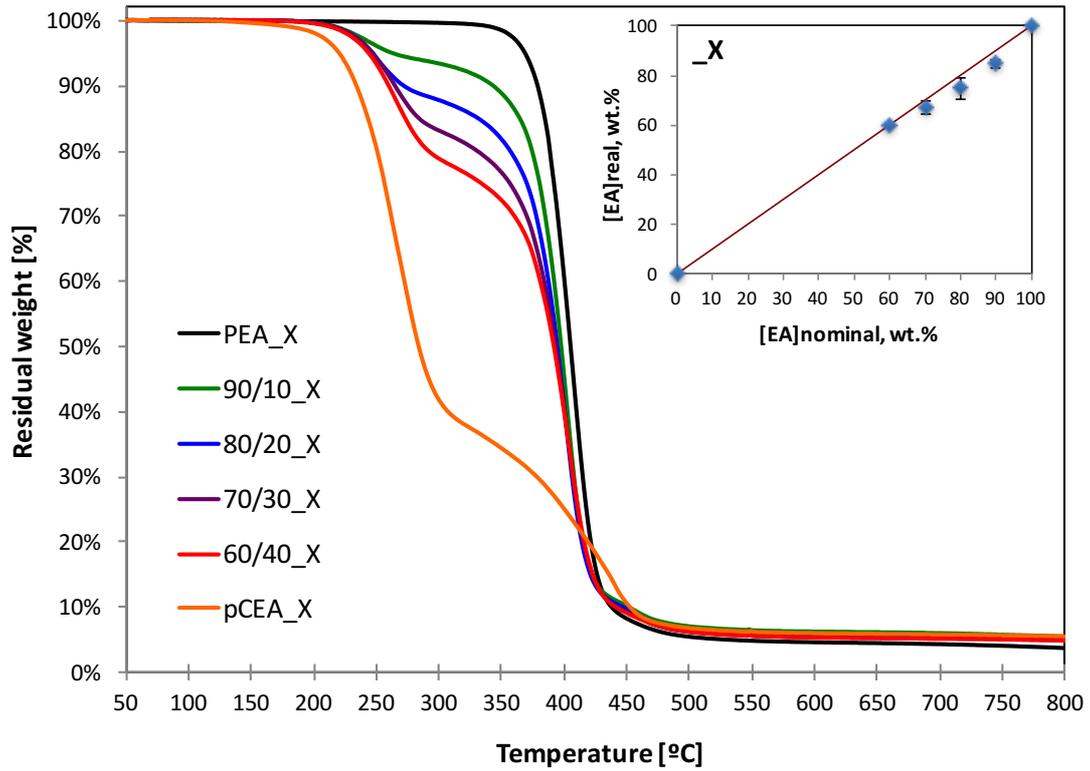


Figura 33. Termogramas de masa residual (arriba) y derivada de su pérdida (abajo), en función de temperatura, para sistemas no entrecruzados.

TGA: Residual Weight (crosslinked)



TGA: Weight Loss Derivative (crosslinked)

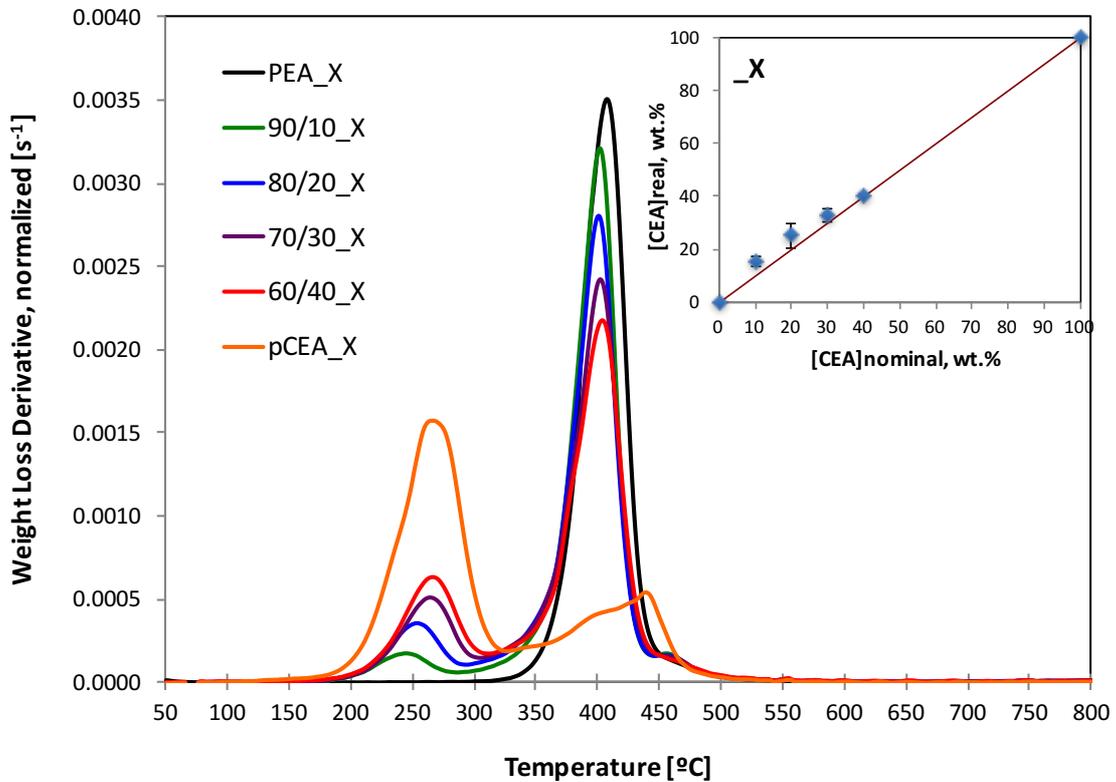


Figura 34. Termogramas de masa residual (arriba) y derivada de su pérdida (abajo), en función de temperatura, para los sistemas entrecruzados.

El hecho de que la degradación térmica de PCEA tiene perfil totalmente diferente que la de PEA nos permitió calcular las fracciones másicas de CEA y EA en cada copolímero y así determinar de manera viable la composición actual de los sistemas copoliméricos desarrollados (Tabla 6, Figura 33 inserto, Tabla 7, Figura 34 inserto) y compararla con la nominal (esperada).

Tabla 6. Composición actual de los sistemas no entrecruzados, determinada por TGA.

| Materiales _noX | Composición Actual (no entrecruzados) | | | | | | |
|--------------------|---------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------|
| | [EA] _{actual} , % | [CEA] _{actual} , % | X _{actual} (EA) | X _{actual} (CEA) | n _{EA} / n _{CEA} | n _{CEA} / n _{EA} | M _n |
| PEA_noX | 100 | 0 | 1.0 | 0.0 | - | 0.00 | 100 |
| 90/10 | 88.80 ± 0.14 | 11.20 ± 0.14 | 0.89 ± 0.00 | 0.11 ± 0.00 | 13.47 | 0.07 | 113 |
| 80/20 | 77.21 ± 0.54 | 22.79 ± 0.54 | 0.77 ± 0.01 | 0.23 ± 0.01 | 5.76 | 0.17 | 130 |
| 70/30 | 73.20 ± 0.62 | 26.80 ± 0.62 | 0.73 ± 0.01 | 0.27 ± 0.01 | 4.64 | 0.22 | 137 |
| 60/40 | 67.46 ± 1.06 | 32.54 ± 1.06 | 0.67 ± 0.01 | 0.33 ± 0.01 | 3.52 | 0.28 | 148 |
| PCEA_noX | 0 | 100 | 0.0 | 1.0 | 0.00 | - | 170 |

Tabla 7. Composición actual de los sistemas entrecruzados, determinada por TGA.

| Materiales _X | Composición Actual (entrecruzados) | | | | | | |
|------------------|------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------|
| | [EA] _{actual} , % | [CEA] _{actual} , % | X _{actual} (EA) | X _{actual} (CEA) | n _{EA} / n _{CEA} | n _{CEA} / n _{EA} | M _n |
| PEA_X | 100 | 0 | 1.0 | 0.0 | - | 0.00 | 100 |
| 90/10 | 84.74 ± 1.85 | 15.26 ± 1.85 | 0.85 ± 0.02 | 0.15 ± 0.02 | 9.44 | 0.11 | 118 |
| 80/20 | 74.96 ± 4.36 | 25.04 ± 4.36 | 0.75 ± 0.04 | 0.25 ± 0.04 | 5.09 | 0.20 | 133 |
| 70/30 | 67.27 ± 2.63 | 32.73 ± 2.63 | 0.67 ± 0.03 | 0.33 ± 0.03 | 3.49 | 0.29 | 149 |
| 60/40 | 59.66 ± 0.23 | 40.34 ± 0.23 | 0.60 ± 0.00 | 0.40 ± 0.00 | 2.51 | 0.40 | 168 |
| PCEA_X | 0 | 100 | 0.0 | 1.0 | 0.00 | - | 170 |

Se puede ver que en los copolímeros no entrecruzados el contenido actual de CEA ligeramente supera su contenido esperado en las muestras 90/10 y 80/20, pero está por debajo del nominal en las muestras 70/30 y 60/40. En los copolímeros entrecruzados, al contrario, el contenido actual de CEA supera significativamente al nominal en las muestras 90/10 y 80/20, supera ligeramente en la muestra 70/30 y prácticamente corresponde al nominal en la 60/40. Estos datos sobre la composición actual de los copolímeros producidos posteriormente se utilizaron para contrastar los datos obtenidos en otros ensayos, en vez de los de la composición nominal.

Una vez determinado el contenido real de CEA en cada sistema copolimérico, se procedió a medir sus volúmenes específicos experimental (actual) y teórico (esperado), tomando los valores correspondientes de homopolímeros como control (Tabla 8, Figura 35).

Tabla 8. Volumen específico de los sistemas entrecruzados y no entrecruzados.

| Material | X_{CEA} | v_{sp} actual, cm^3/g | v_{sp} teórico, cm^3/g | Δ , % |
|----------|-----------|---|--|--------------|
| PEA_noX | 0.00 | 0.883 ± 0.003 | 0.883 | 0.00% |
| 90/10 | 0.11 | 0.867 ± 0.001 | 0.865 | 0.41% |
| 80/20 | 0.23 | 0.854 ± 0.002 | 0.847 | 1.20% |
| 70/30 | 0.27 | 0.840 ± 0.001 | 0.841 | 0.20% |
| 60/40 | 0.33 | 0.827 ± 0.002 | 0.832 | -0.15% |
| PCEA_noX | 1.00 | 0.728 ± 0.004 | 0.728 | 0.00% |
| PEA_X | 0.00 | 0.880 ± 0.000 | 0.880 | 0.00% |
| 90/10 | 0.15 | 0.865 ± 0.002 | 0.856 | 0.80% |
| 80/20 | 0.25 | 0.852 ± 0.001 | 0.841 | 0.98% |
| 70/30 | 0.33 | 0.842 ± 0.002 | 0.829 | 1.18% |
| 60/40 | 0.40 | 0.830 ± 0.007 | 0.817 | 1.65% |
| PCEA_X | 1.00 | 0.724 ± 0.001 | 0.724 | 0.00% |

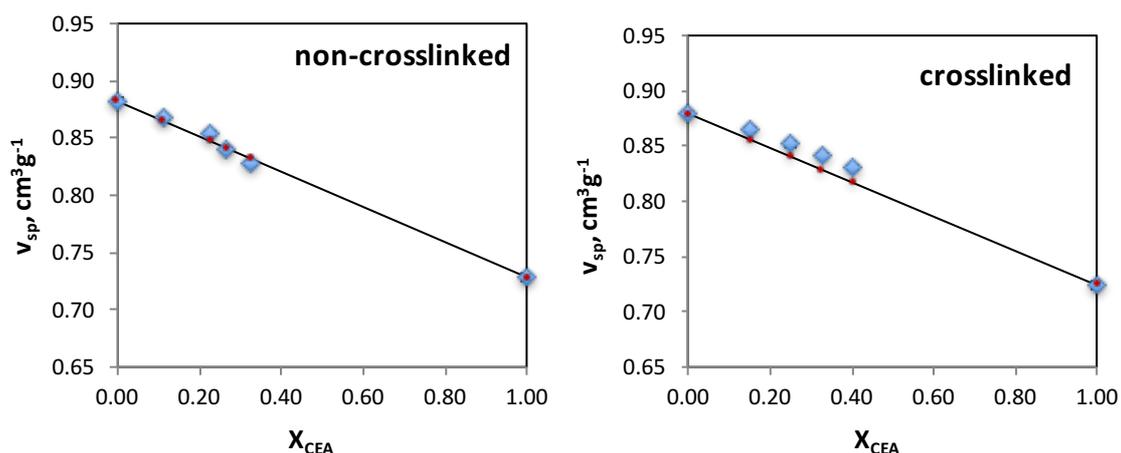


Figura 35. Volumen específico de los sistemas entrecruzados y no entrecruzados, respecto al contenido actual de CEA.

En cuanto a los homopolímeros, en ambos tipos de sistemas (entrecruzados y no entrecruzados) el volumen específico de PCEA es significativamente menor que el de PEA, y en sus respectivos copolímeros el volumen específico adquiere valores intermedios, reflejando la composición actual y disminuyendo según aumenta el contenido de CEA. Cabe destacar que los sistemas entrecruzados muestran valores de volumen específico bastante similares a los de no entrecruzados, siendo ligeramente menores en caso de homopolímeros y copolímeros con alto contenido de EA. Lo último es debido a las limitaciones estéricas impuestas por el propio fenómeno de reticulación del polímero, con los nudos fijos de la red polimérica, frente a los polímeros no reticulados. Además, se nota

que los valores experimentales del volumen específico siguen la misma tendencia de su disminución monótona con el aumento del contenido de CEA, que los valores teóricos, calculados considerando la composición actual de los materiales. Sin embargo, en el caso de sistemas no entrecruzados, los valores experimentales ligeramente superan a los teóricos en los materiales con mayor contenido de EA, mientras que en los sistemas entrecruzados los valores experimentales siempre son mayores que los teóricos, y dicha diferencia aumenta mientras crece el contenido de CEA en ellos. No obstante, las desviaciones de la idealidad observadas son mínimas, significando que los dos componentes, EA y CEA, son aditivos y no suelen producir repulsión ni volúmenes de exceso.

Tanto en los copolímeros entrecruzados, como en los no entrecruzados se detectó una sola T_g , que además toma valores intermedios entre las T_g de respectivos homopolímeros y está en buena correlación con la composición actual de copolímeros (Figura 36, Figura 37). Esto indica que los sistemas copoliméricos producidos no son mezclas de homopolímeros, ni copolímeros en bloque, y las unidades de EA y CEA no producen los dominios suficientemente grandes para mostrar su propia transición vítrea (no se revela alguna separación de fases entre EA y CEA), por lo que deben ser copolímeros al azar, igual que se pretendía producir. Sin embargo, la anchura de transición vítrea (ΔT_g) aumenta con el contenido de CEA, llegando al máximo en homopolímeros de PCEA, lo que supone un incremento de heterogeneidad en la matriz polimérica, en concreto entre el tamaño de las regiones moleculares que realizan reordenamientos cooperativos y se relajan durante la transición vítrea. Esa heterogeneidad debe ser introducida por el propio CEA, ya que es una mezcla de 4 tipos de oligómeros, de diferente peso y longitud de cadena (Figura 30), por lo que el valor de ΔT_g en PCEA_X es el doble que en PEA_X (10.10°C contra 5.14°C), y esa diferencia es aún mayor entre los homopolímeros no entrecruzados (13.00°C contra 4.36°C).

Otra tendencia interesante muestra el salto de la capacidad calorífica durante la transición vítrea, Δc_p , que refleja la cantidad de la fase amorfa que sufre la Transición vítrea. En otras palabras, Δc_p es proporcional al número de unidades que eran inmovilizadas en estado vítreo (por debajo de la T_g), y que empiezan a realizar movimientos tras pasar al estado de goma (por encima de la T_g). La subida de Δc_p de 0.333 Jg⁻¹K⁻¹ en puro PEA_X hasta 0.461 Jg⁻¹K⁻¹ en PCEA_X significa que en el último hay mayor número de cadenas poliméricas que sufren cambios conformacionales durante la transición vítrea, y esa tendencia, de manera proporcional, se puede ver en

sus respectivos copolímeros (Figura 37). En los sistemas no entrecruzados Δc_p experimenta una subida aún mayor: desde $0.327 \text{ Jg}^{-1}\text{K}^{-1}$ en puro PEA_noX hasta $0.508 \text{ Jg}^{-1}\text{K}^{-1}$ en PCEA_noX, pasando por los valores intermedios en sus respectivos copolímeros.

La temperatura de inicio de transición vítrea, T_{Onset} y la propia T_g muestran una evolución significativa hacia valores más altos con el aumento del contenido de CEA en los sistemas. En puro PEA_noX la transición vítrea empieza a -15.8°C y alcanza la T_g está a -14.3°C , mientras que en puro PCEA_noX los valores correspondientes son de 3.73°C y 9.6°C , correspondientemente, adquiriendo valores intermedios en sus respectivos copolímeros. La reticulación de los sistemas causa un desplazamiento de fenómenos estudiados a temperaturas más altas (Figura 39). Así, en puro PEA_X la transición vítrea empieza a -14.7°C y alcanza la T_g a -12.9°C , mientras que en puro PCEA_X los valores correspondientes son de 9.9°C y 14.8°C , siendo esta subida de la misma manera, pero en escala menor, reflejada en todos sus respectivos copolímeros (Figura 38).

Para determinar la desviación del estado real de los sistemas del esperado, teórico, los valores experimentales de T_g de sistemas copoliméricos fueron comparados con los teóricos, calculados mediante las ecuaciones de Fox (Ecuación 5) y Couchman-Karasz (Ecuación 6) [120]. En los copolímeros no entrecruzados, la T_g experimental es significativamente más alta que la prevista por los dos modelos, y esa desviación (sobre todo, con el de Fox) aumenta bruscamente con el mayor contenido de CEA, mientras que los sistemas 90/10 y 80/20 se comportan más de acuerdo con el modelo de Couchman-Karasz (Figura 36). El comportamiento de los copolímeros entrecruzados se acuerda mejor con los dos modelos (especialmente, con el de Couchman-Karasz), mostrando un ligero aumento de la desviación con el contenido de CEA (Figura 37). Eso nos permitió llegar a la conclusión de que las unidades de CEA aportan muchos grupos funcionales capaces de formar los enlaces de hidrógeno que aumentan la estabilidad térmica del sistema y causan un efecto general reforzante, más llamativo en los sistemas no entrecruzados, aplazando el progreso de la Transición vítrea a temperaturas más altas (Figura 38).

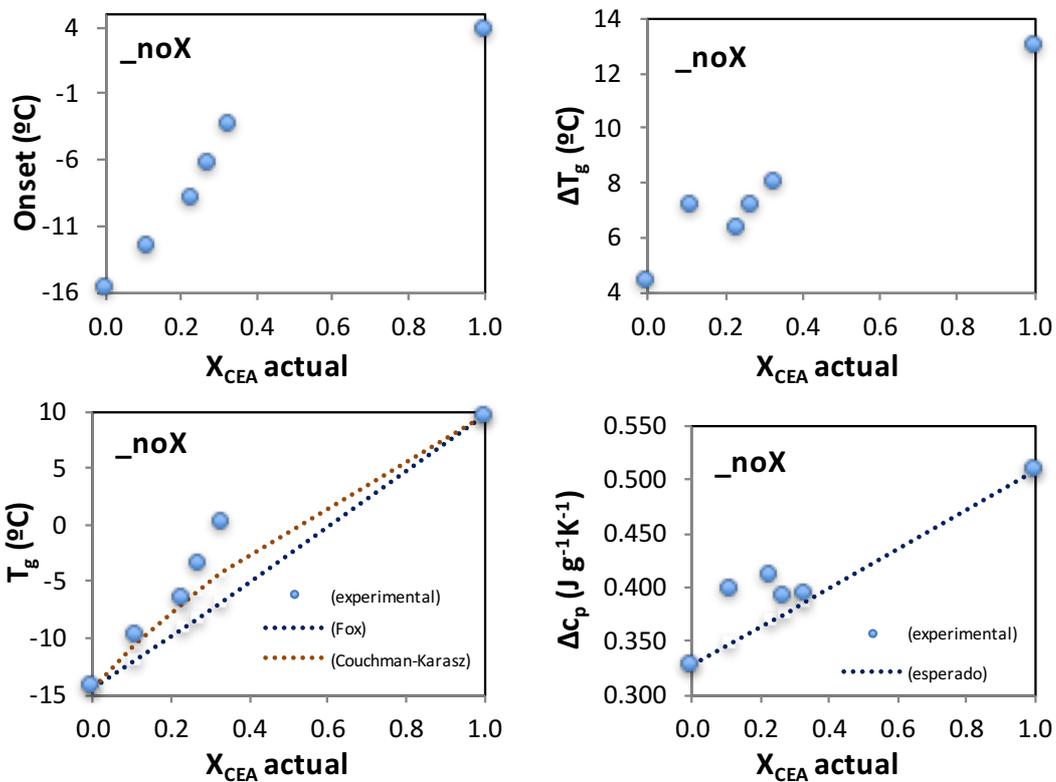
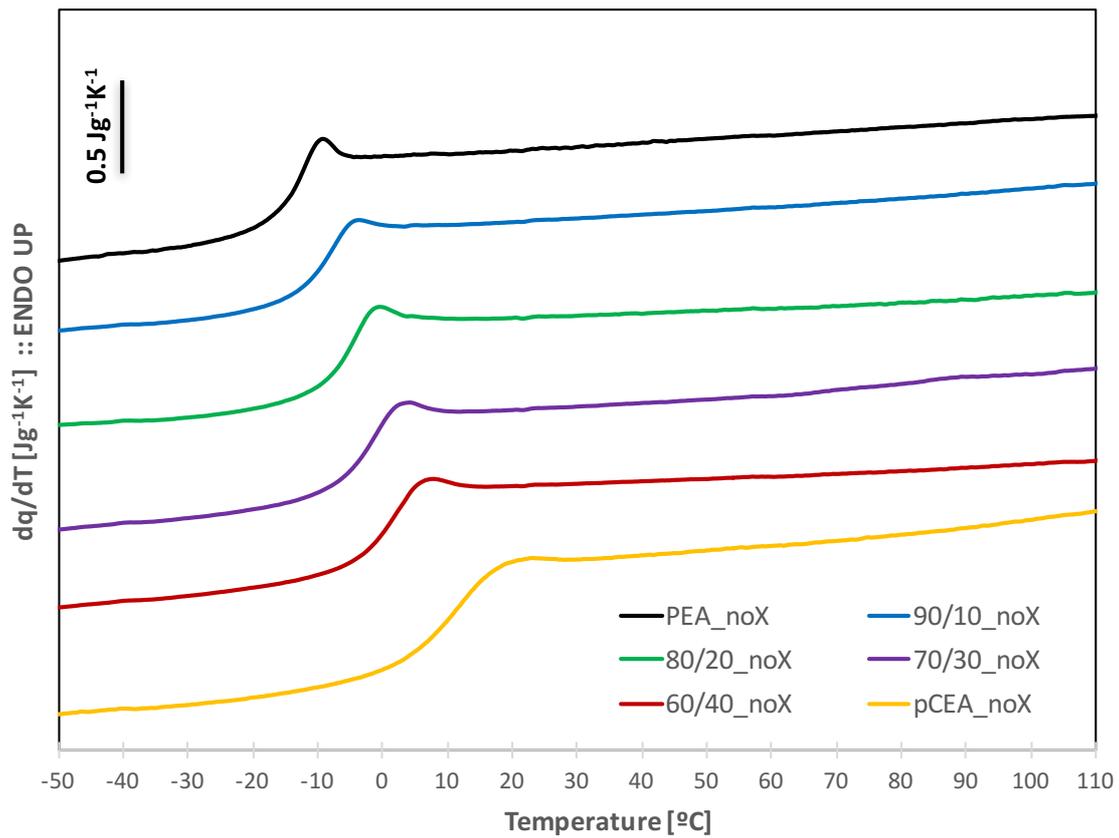


Figura 36. Arriba: termogramas de DSC para los sistemas no entrecruzados. Abajo: Onset, ΔT_g , T_g y Δc_p , en función del contenido de CEA en los materiales.

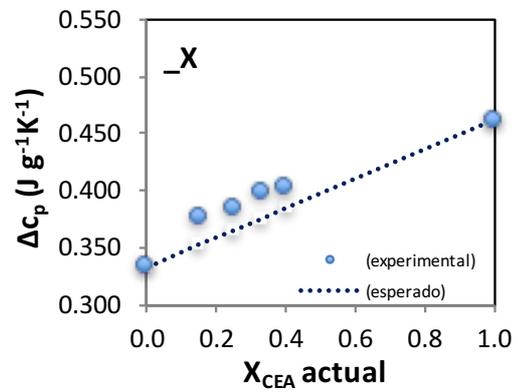
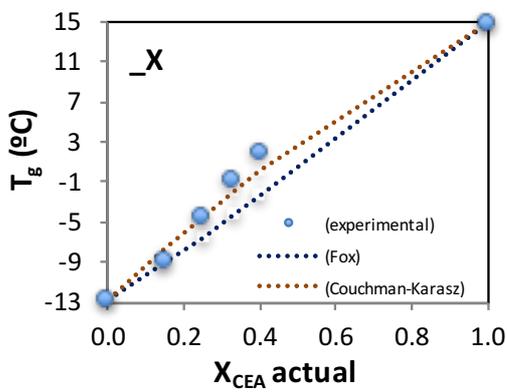
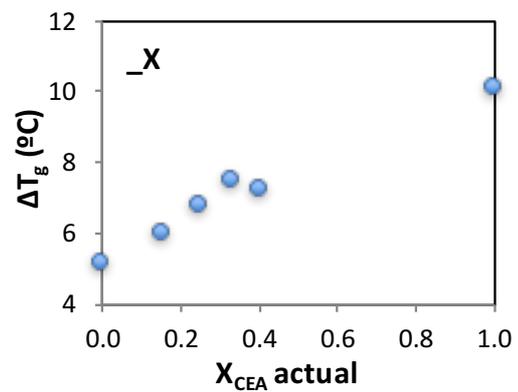
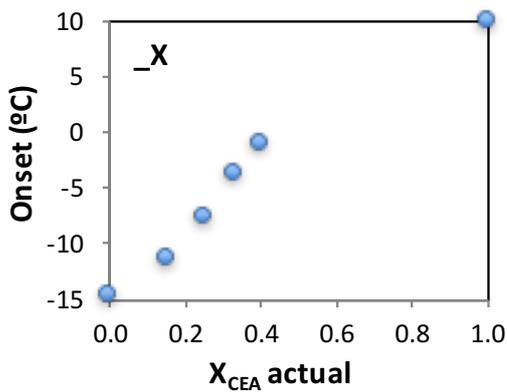
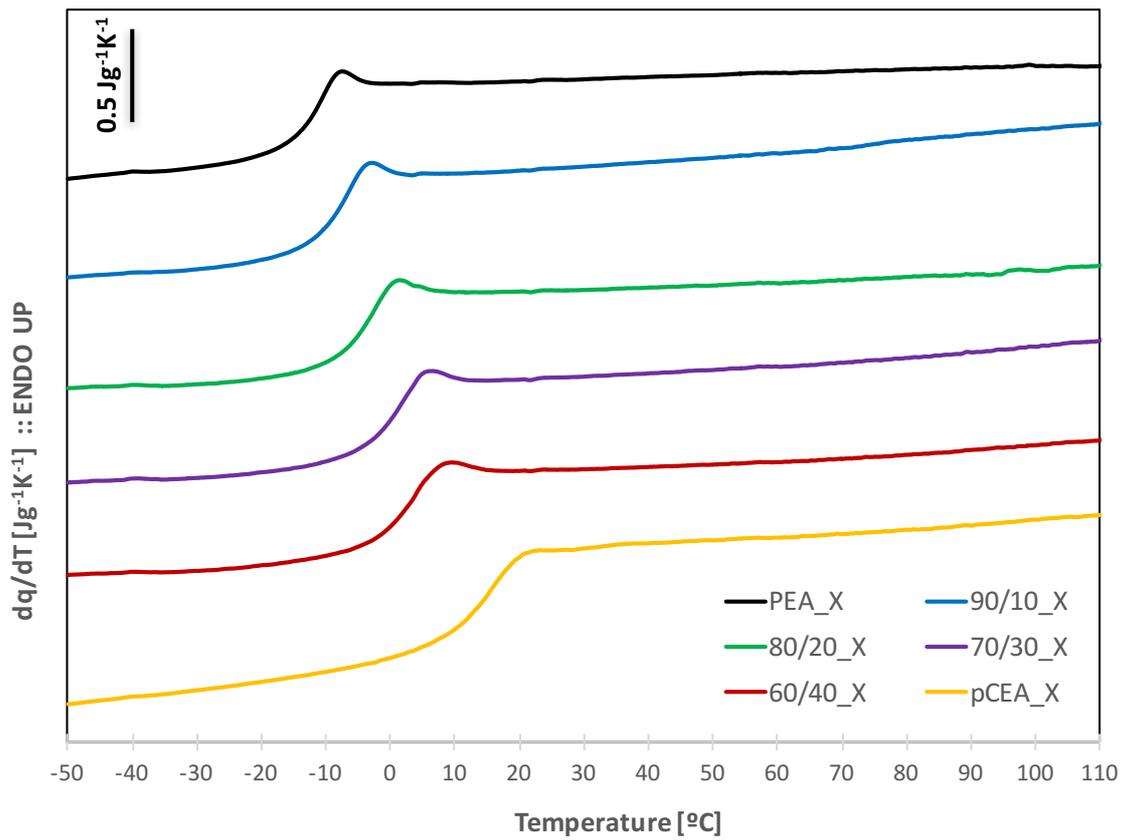


Figura 37. Arriba: termogramas de DSC para los sistemas entrecruzados. Abajo: Onset, ΔT_g , T_g y Δc_p , en función del contenido de CEA en los materiales.

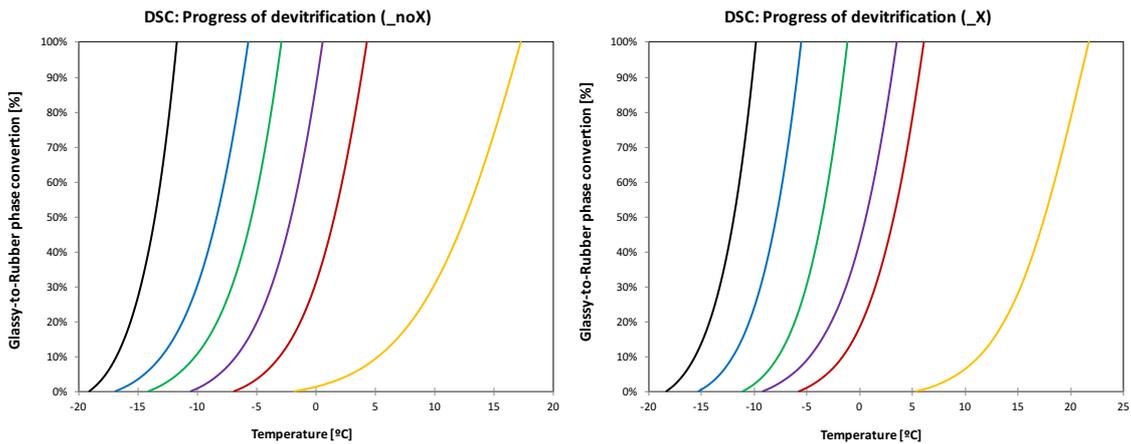


Figura 38. Progreso de desvitrificación con temperatura en los sistemas entrecruzados (derecha) y no entrecruzados (izquierda).

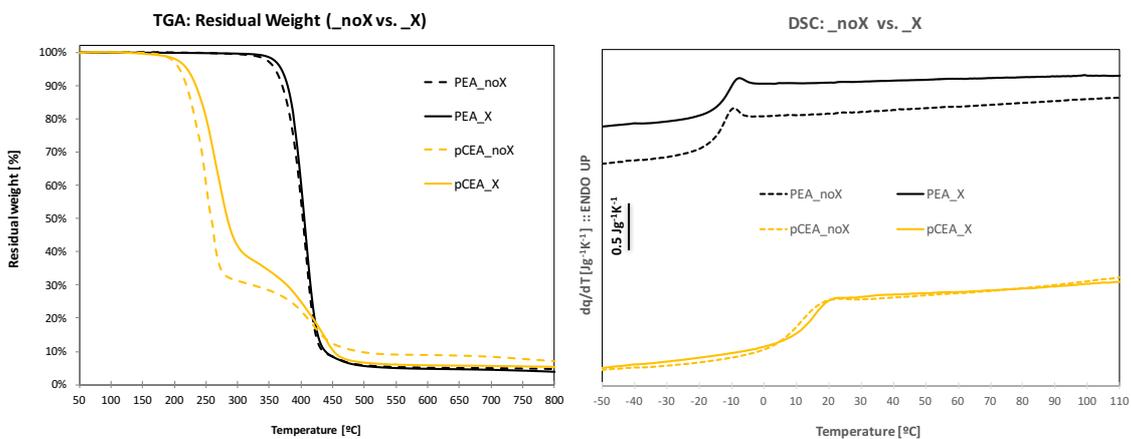


Figura 39. El efecto de entrecruzamiento en los homopolímeros, revelado por los ensayos de TGA (izquierda) y DSC (derecha).

En cuanto al módulo de almacenamiento, los valores del módulo vítreo (por debajo de la T_g) están del orden de 10^9 Pa (Tabla 9), sin mostrar alguna correlación clara con el contenido de CEA (aunque PCEA, tanto entrecruzado como no, siempre muestra valor de E' por encima de PEA y los copolímeros). La caída del módulo de almacenamiento, asociada con la relajación principal debida a la transición vítrea, sigue la misma tendencia revelada en DSC: a mayor contenido de CEA, la relajación tiene lugar a temperatura más alta. Esa misma tendencia también se refleja en los valores de T_α , temperatura de la relajación principal (del máximo valor del tangente del ángulo de pérdidas, $\tan \delta = E'' / E'$), que puede ser interpretada como análogo de temperatura de transición vítrea, T_g , devuelta por DSC, aunque siempre toma valores más altos que la T_g . Así, en sistemas entrecruzados los valores de T_α muestran una correlación prácticamente lineal con el contenido actual de CEA, y en los sistemas no entrecruzados, una correlación menos lineal (Figura 40 inserto, Figura 41 inserto). Los

valores del módulo de goma (por encima de la T_g) están del orden de 10^5 Pa, tampoco mostrando alguna correlación exacta con el contenido de CEA.

Tabla 9. Valores del módulo de almacenamiento (E') en estado de vítreo y de goma, así como la temperatura de relajación principal, para los sistemas entrecruzados y no entrecruzados.

| Sistemas no entrecruzados | E'_{glassy} (-60°C) | T_{α} | E'_{rubber} (37°C) | Sistemas entrecruzados | E'_{glassy} (-60°C) | T_{α} | E'_{rubber} (37°C) |
|---------------------------|---------------------------------|--------------|--------------------------------|------------------------|---------------------------------|--------------|--------------------------------|
| | Pa | °C | Pa | | Pa | °C | Pa |
| PEA_noX | 2.57E+09 | -5.2 | 6.98E+05 | PEA_X | 2.65E+09 | -3.3 | 6.89E+05 |
| 90/10 | 1.58E+09 | 0.3 | 4.31E+05 | 90/10 | 1.69E+09 | 1.5 | 5.05E+05 |
| 80/20 | 3.05E+09 | 1.4 | 1.02E+06 | 80/20 | 1.97E+09 | 5.1 | 5.94E+05 |
| 70/30 | 2.26E+09 | 4.0 | 3.44E+05 | 70/30 | 2.37E+09 | 7.0 | 5.80E+05 |
| 60/40 | 1.64E+09 | 7.2 | 4.79E+05 | 60/40 | 3.33E+09 | 10.5 | 3.57E+05 |
| PCEA_noX | 7.43E+09 | 18.7 | 7.08E+05 | PCEA_X | 4.40E+09 | 26.6 | 1.45E+06 |

No obstante, en la Figura 40 se observa un fenómeno muy revelador en cuanto a la estructura de fases de los copolímeros. En los copolímeros no entrecruzados se notan pequeños “hombros” que aparecen en los picos de $\tan \delta$ de los sistemas 80/20, 70/30 y 60/40 a temperatura que corresponde a la relajación en PEA. Dicho fenómeno indica la presencia de cierta separación de fases en estos sistemas, revelando su carácter bifásico: una fase, muy minoritaria, rica en dominios de EA y de tamaño pequeño (por lo que no es detectable en DSC), y otra fase, mayoritaria, siendo una mezcla compatible de las unidades de EA y CEA y de tamaño más grande (que sí que se detecta en DSC). En los copolímeros entrecruzados dicha separación de fases no se detecta mediante DMTA, por lo que se puede concluir que la reticulación ayuda a compatibilizar las fases, haciendo más difícil la segregación de los dominios de EA y CEA, y de esta manera aumenta la homogeneidad estructural de los sistemas copoliméricos.

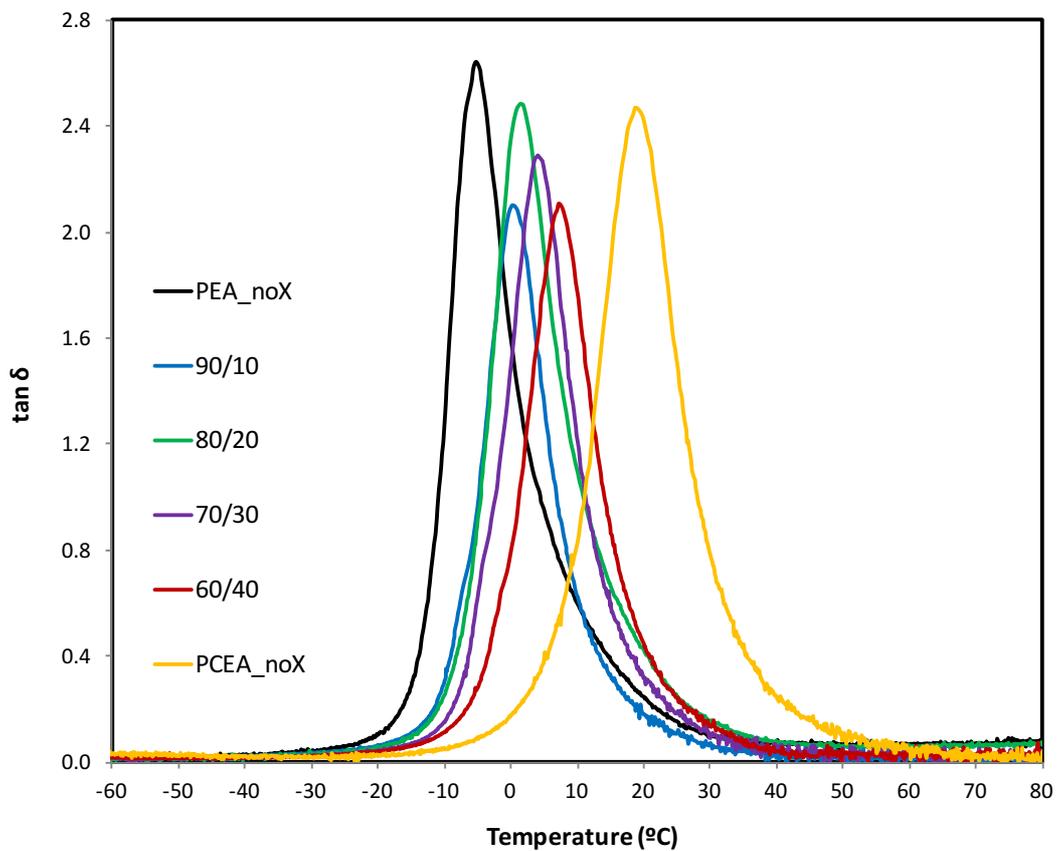
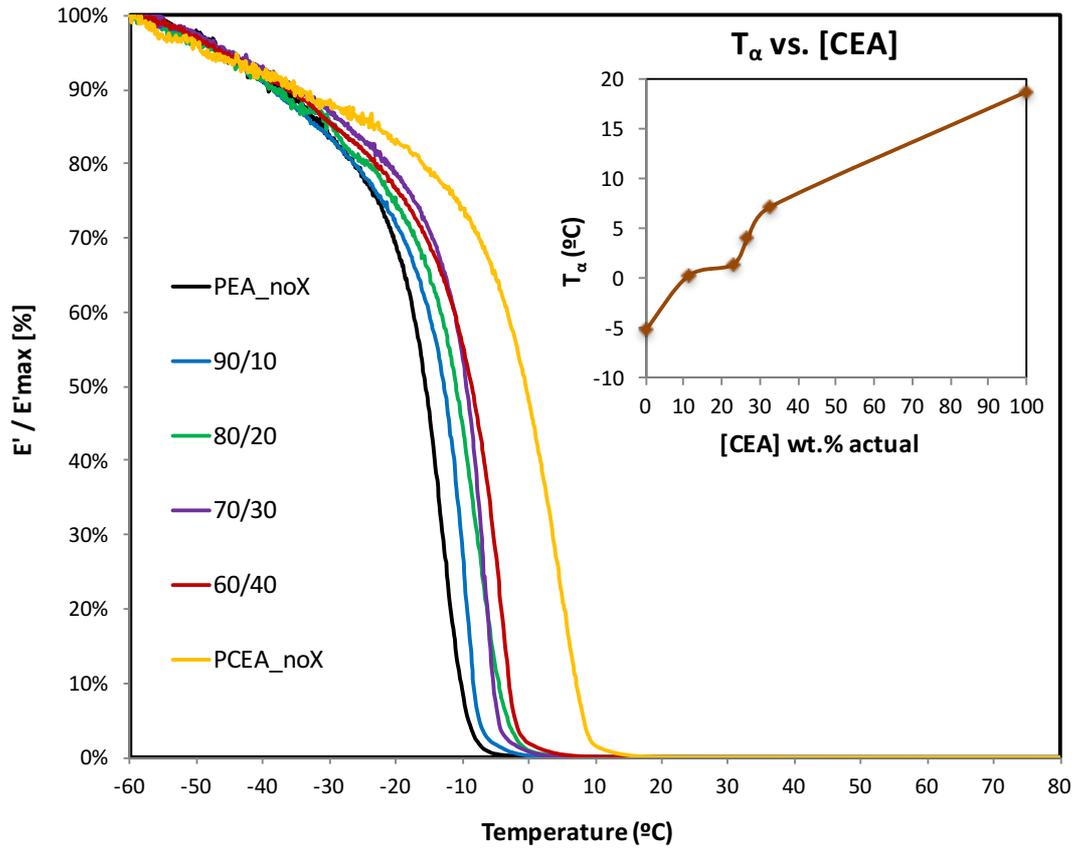


Figura 40. Caída del módulo de almacenamiento (E'/E' inicial, en %) y el tangente de pérdidas ($\tan \delta$), respecto a temperatura, en los sistemas no entrecruzados. Inserto: temperatura de relajación principal (T_{α}) en función del contenido actual de CEA.

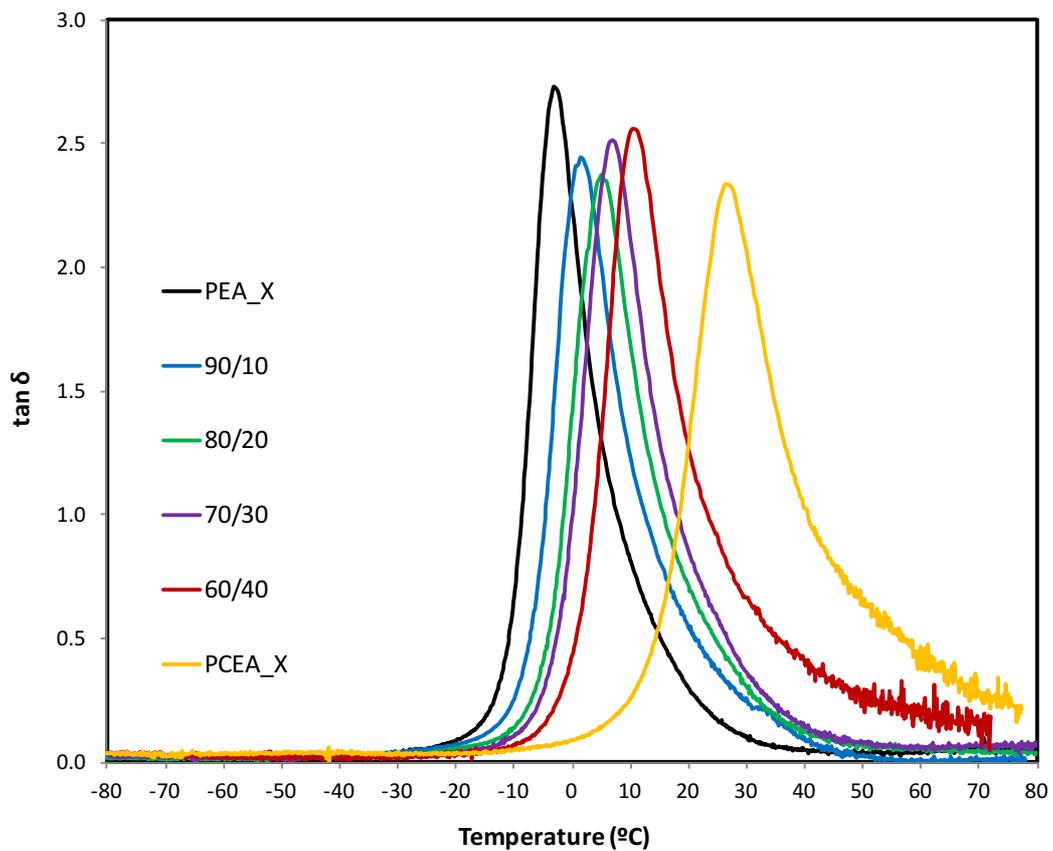
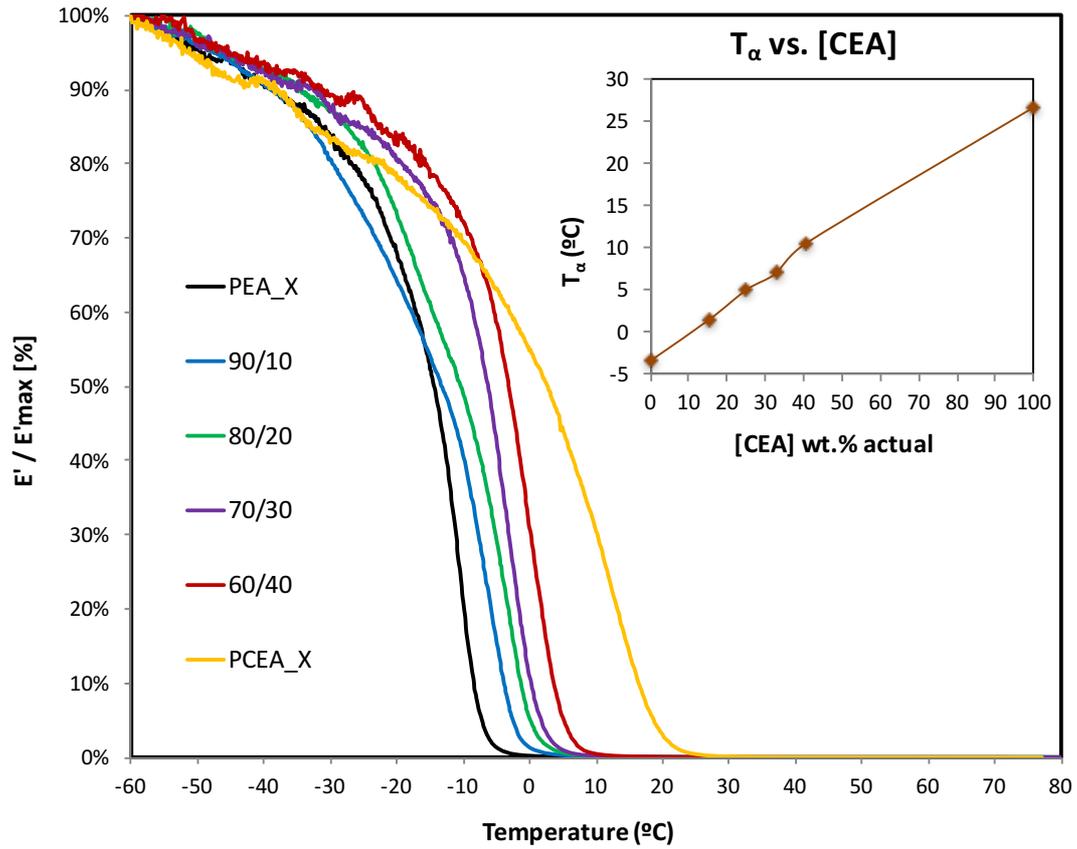


Figura 41. Caída del módulo de almacenamiento (E'/E' inicial, en %) y el tangente de pérdidas ($\tan \delta$), respecto a temperatura, en los sistemas entrecruzados. Inserto: temperatura de relajación principal (T_{α}) en función del contenido actual de CEA.

Para establecer un protocolo de tratamiento correcto de PCEA_noX, se estudió su comportamiento en los disolventes de mayor interés: acetona, etanol, ácido fórmico (FA), isopropanol, tetrahidrofurano (THF), N,N-dimetilformamida (DMF), agua desionizada, sosa 0.2M, ciclohexano, tolueno, dioxano, cloroformo y metanol. Sin embargo, este homopolímero se mostró prácticamente insoluble en la mayoría de los disolventes convencionales, tanto polares como apolares. Tras 24h de agitación, PCEA_noX solo fue disuelto en Sosa, mostrando un hinchamiento moderado en acetona, etanol, THF, agua, tolueno y cloroformo, y un hinchamiento más expresado en FA, DMF, dioxano y metanol. Tras 72h de agitación, se consiguió su disolución parcial en FA, dioxano y metanol, y un hinchamiento intenso en el resto de los disolventes (salvo ciclohexano, que no afectó el estado del polímero). Además, a la hora de secar los discos hinchados utilizados en las pruebas, PCEA_noX mostró una fuerte tendencia de retener algunos disolventes (como FA, DMF, etanol) atrapados en su matriz polimérica, por lo que el proceso de secado solo fue posible aplicando extracción a vacío a 40°C durante 24-48 horas.

Estos fenómenos observados son índice claro de existencia de numerosos puentes de hidrógeno presentes en el PCEA que estabilizan su estructura impidiendo la separación y movimiento libre de cadenas, que son las condiciones indispensables del proceso de disolución de un polímero no reticulado. Sosa, al parecer, sustituye los hidrógenos (o más bien los protones, H⁺) de los grupos carboxilo, que participan en los puentes de hidrógeno en PCEA, por los cationes de sodio, Na⁺, de esta manera destruyendo los puentes de hidrógeno que restringían el polímero, y haciendo posible su disolución. No obstante, para poder utilizar Sosa como disolvente para PCEA_noX, había que comprobar que no causa alguna degradación sobre sus cadenas, por lo que la disolución de PCEA_noX en sosa fue sometida a un *solvent casting* a temperatura ambiente, y sobre los *films* producidos de esta manera fue realizado un estudio adicional, aplicando las técnicas de FTIR, TGA y DSC. Sus resultados (Figura 42) indicaron que sosa causa cierta degradación de PCEA, por lo que la opción de utilizarla como respectivo disolvente fue descartada.

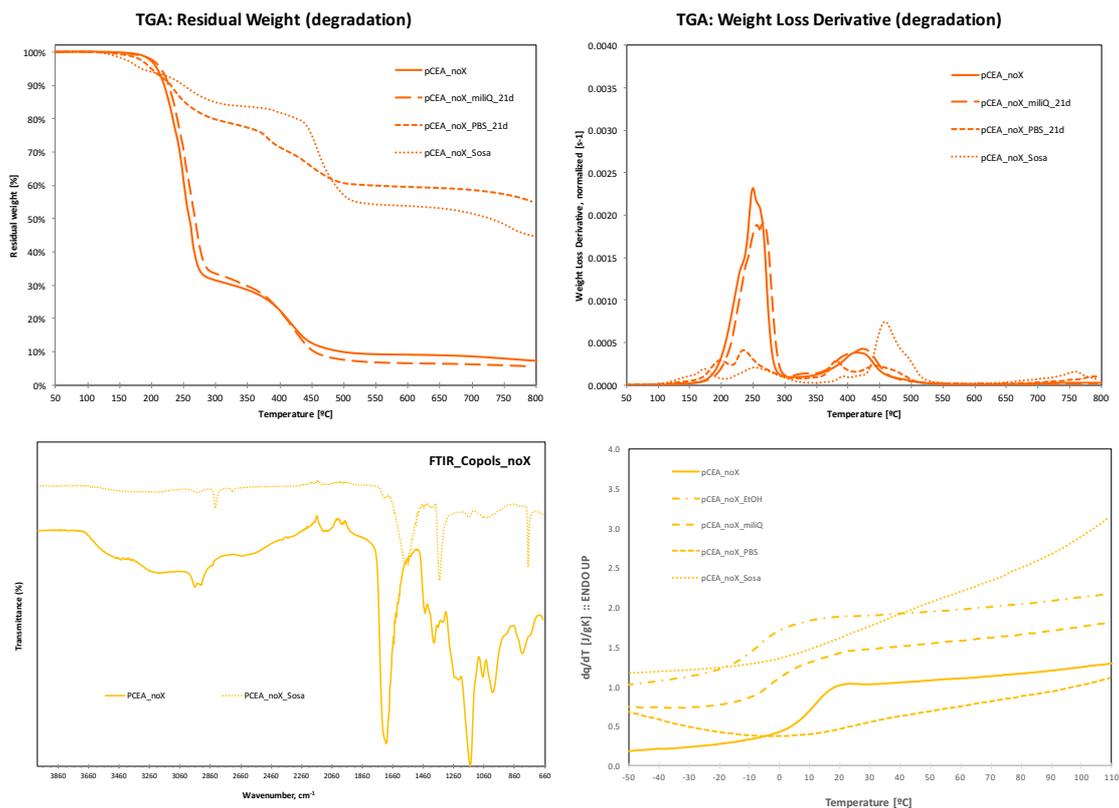


Figura 42. Efectos de algunos medios sobre la composición y propiedades térmicas de PCEA_noX.

En paralelo, fue estudiada la solubilidad de los copolímeros no entrecruzados en FA, y solo el sistema 90/10 se manifestó lo suficientemente soluble en FA, aunque requiriendo aplicar para esto un calentamiento de hasta 80°C y una agitación intensa durante más de 24 horas, mientras que los sistemas 80/20, 70/30 y 60/40 manifestaron más bien un hinchamiento intenso (hasta desintegración parcial), pero no un proceso de disolución completa. Tan escasa solubilidad es totalmente entendible, ya que el ácido fórmico, al contrario de sosa, protoniza los grupos carboxilo de PCEA, preservando los puentes de hidrógeno existentes, por lo que hace falta aplicar un calentamiento extra en acción conjunta con la agitación intensa para romper estos puentes y conseguir la solubilidad del polímero. Otros disolventes, como acetona y dioxano, mostraron resultados mucho más moderados, causando en condiciones similares un hinchamiento notable de los sistemas copoliméricos no entrecruzados, pero sin llegar a disolver ni el copolímero 90/10_noX.

Para evaluar el comportamiento de los sistemas entrecruzados, se estudió su hinchado en inmersión en 4 medios diferentes: agua desionizada, ácido fórmico, acetona y dioxano. En el caso de agua, se hizo también un ensayo similar con los sistemas no entrecruzados, ya que no cabía esperar ninguna disolución en este caso. En cuanto al hinchamiento en agua desionizada (Figura 43, Tabla 10), PCEA_noX presentó un hinchamiento 20 veces superior al de resto de los materiales (incremento de peso de más de 2108%), mientras que el PEA_noX obviamente apenas absorbía agua (menos de 2% de incremento de peso). Sin embargo, el hinchamiento de los copolímeros manifestó un fenómeno inesperado: su grado se reducía con el aumento del contenido de CEA, en vez de aumentar, como había de esperarse (ya que los grupos funcionales que atraen agua son los carboxilos hidrófilos de las unidades de CEA). El sistema 90/10_noX era la que consiguió el mayor hinchamiento en 2 semanas de ensayo (>76%) y el hinchamiento de los otros copolímeros era progresivamente menor, alcanzando el mínimo en el sistema 60/40_noX (casi 16%). Los sistemas entrecruzados obviamente se hincharon mucho menos que los no entrecruzados, debido al efecto restrictivo de la reticulación entre las cadenas que formaron una red copolimérica. Los homopolímeros, PCEA_X y PEA_X exhibieron, correspondientemente, el máximo (<50%) y el mínimo (>2%) hinchamiento. Los copolímeros entrecruzados siguieron la misma tendencia progresiva que los no entrecruzados (salvo el sistema 60/40_X, con resultados algo particulares) aunque, evidentemente, de menor grado. Resumiendo, el comportamiento de los dos tipos de sistemas en agua confirma el aporte significativo de hidrofiliidad conferida por unidades de CEA a la matriz polimérica.

En acetona el que menos se hinchó fue PCEA_X ($\approx 230\%$), el resto de materiales revelaron un hinchamiento bastante similar, entre 350 y 400%. En dioxano, que es un disolvente menos polar que acetona, el PCEA exhibió el menor hinchamiento (>500%) y el PEA, el mayor (>710%), mientras que los copolímeros manifestaron un comportamiento intermedio, bastante similar entre ellos (en torno de 600%). En ácido fórmico, que es un disolvente mucho más polar que acetona y dioxano, ocurrió un fenómeno muy singular: los copolímeros, en vez de manifestar un comportamiento intermedio, se hincharon más ($\approx 760\%$) que los homopolímeros, y de los últimos, PCEA_X se hinchó mucho más que PEA_X ($\approx 650\%$ contra $\approx 540\%$). En general, el alto grado de hinchamiento mostrado por los sistemas copoliméricos entrecruzados en los disolventes orgánicos (siempre siendo mayor que en agua) significa que en estos predomina el carácter hidrófobo, conferido por unidades de EA como el componente mayoritario (Figura 44).

Tras finalizar estos ensayos, los materiales fueron cuidadosamente desecados y sometidos a unos ensayos de caracterización físico-química (FTIR, TGA, DSC), como empleados en el Capítulo 3, para poder detectar posibles alteraciones en su estructura y composición. No fueron detectadas alteraciones considerables, lo que significa que durante 7-14 días en inmersión en agua desionizada, ácido fórmico, acetona y dioxano, los sistemas ensayados no sufrieron alguna degradación importante. Esto corrobora la aptitud del uso de estos disolventes con los sistemas producidos, para diferentes tipos de tratamiento en laboratorio.

Vistos los resultados de la serie de ensayos de hinchamiento, fue decidido llevar otras dos pruebas complementarias, esta vez en agua milliQ (como no electrolito) y en PBS (electrolito, que además reproduce la composición salina y el pH del medio fisiológico), y de duración mayor que los ensayos anteriores – 21 días frente a 14 días, para poder asegurarse de llevar los sistemas hasta el equilibrio o hasta el inicio de su degradación. Además del peso, esta vez también se procedía a medir el diámetro de los discos hinchados, ya que en los ensayos anteriores se observó un importante hinchamiento en tamaño de algunos sistemas.

Los resultados del hinchamiento en el agua milliQ (Figura 45, Figura 46, Figura 49 arriba, Figura 50) en general parecieron a los del agua desionizada, aunque esta vez el PCEA_noX exhibió un hinchamiento moderado, tanto en peso, como en diámetro, siendo el máximo hinchamiento mostrado por el copolímero 90/10_noX, con mucha disparidad de los otros sistemas no entrecruzados. Y, en cuanto a los entrecruzados, el hinchamiento máximo en peso y en tamaño fue observado en el PCEA_X, mientras que los copolímeros mostraron un hinchamiento progresivamente menor con el aumento del contenido de CEA. Por otro lado, cabe destacar los fenómenos ópticos ocurridos en los materiales tras el hinchado, recordando que en estado seco todos ellos eran transparentes. En los sistemas no entrecruzados, solo homopolímero de PEA muestra cierta transparencia, mientras que los copolímeros y homopolímero de PCEA aparecen blancos y traslúcidos. Los sistemas entrecruzados, en general, muestran una transparencia mayor (sobre todo, puro PCEA y, en menor grado, puro PEA), mientras que los copolímeros muestran diferente grado de translucidez, siempre menor que los no entrecruzados. Como transparencia es el indicio de homogeneidad del sistema y translucidez, al contrario, el indicio de heterogeneidad, otra vez se comprueba que el reticulado de la matriz copolimérica la aporta mayor grado de uniformidad. En los términos de hinchado, el agua absorbida por un sistema homogéneo está distribuida uniformemente en todo su tejido,

resultando en un aspecto transparente, mientras que, en un sistema heterogéneo, el agua tiende a concentrarse en las regiones ricas en grupos que contribuyen en su absorción (grupos hidrófilos, como hidroxilos o carboxilos), provocando la traslucidez. Dado que la luz se difracta al incidir de dominios de más de 400 nm de tamaño, podemos concluir sobre la presencia de tales dominios en los sistemas caracterizados, en función de su traslucidez tras el hinchado. También cabe destacar que un fenómeno parecido fue observado tras el hinchado de los materiales en el agua desionizada descrito anteriormente, mientras que el hinchado los disolventes orgánicos (FA, acetona, dioxano) no alteraba la transparencia inicial de todos los sistemas, su propiedad intrínseca para el estado seco.

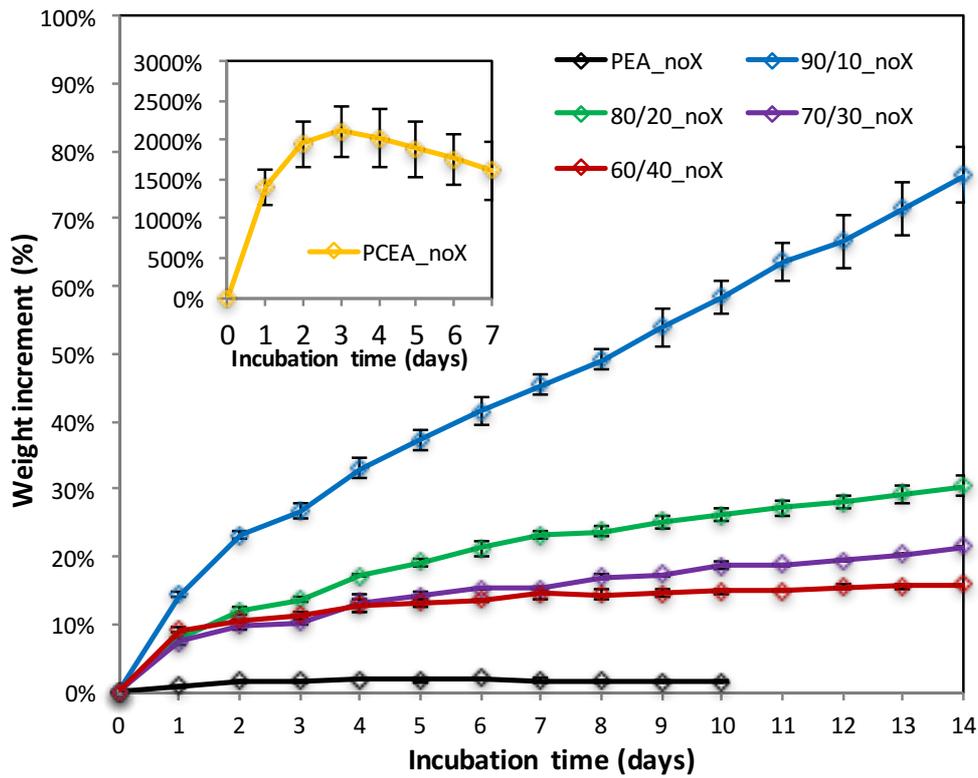
Una gran sorpresa fue obtenida con el hinchamiento de materiales en el PBS (Figura 47, Figura 48, Figura 49 abajo, Figura 50). En este caso, al contrario del hinchado en agua desionizada y agua milliQ, tanto en sistemas no entrecruzados (que hincharon más), como en entrecruzados (que hincharon menos), se observó una correlación directa entre el grado de hinchamiento y el contenido de CEA. El hinchamiento de PCEA_noX y PCEA_X, tanto en masa, como en tamaño, siempre superaba el de los copolímeros (siendo el de PEA totalmente despreciable), y entre los copolímeros se hincharon más los que tenían mayor contenido de CEA. En comparación con el hinchado en agua, tras el hinchado en PBS todos los sistemas mostraron mayor grado de transparencia y menor traslucidez, sobre todo los entrecruzados (donde solo el sistema 90/10_X era bastante traslúcida), mientras que en los copolímeros no entrecruzados la transparencia manifestaba correlación inversa con el contenido de CEA.

Los datos experimentales obtenidos en los ensayos y fenómenos comentados apuntan sobre una particular estructura de fase (en forma de organización de dominios) que tiene lugar en los sistemas copoliméricos. Concluimos que en los sistemas 90/10, que tienen poco CEA, todo el CEA presente está disponible para absorber el agua e hincharse, por lo que ellos muestran valores tan altos de hinchamiento en agua. Sin embargo, en los copolímeros con alto contenido de CEA (≥ 20 wt.%), los abundantes dominios hidrófilos de CEA, auto-estabilizados por numerosos puentes de hidrógeno, se encuentran rodeados y apantallados con un “mar” hidrófobo de unidades de EA, por donde no puede llegar el agua. En principio, en estado seco inicial, esos dominios no están tan “formalizados”, sino que van organizándose durante la absorción de agua por el material y su hinchamiento consecutivo. En otras palabras, la gran cantidad de unidades

de CEA presentes en estos sistemas, no está disponible para el agua, sino que está “oculta” en los dominios “escondidos”, lo que originó los resultados en principio inesperados en esta parte de caracterización de sistemas copoliméricos.

Por otro lado, en el caso de PBS, los cationes presentes en el medio sustituyen los H^+ en los grupos carboxilos de unidades de CEA, “disolviendo” así los puentes de hidrógeno y permitiendo a los copolímeros absorber agua e hincharse proporcionalmente a su contenido actual de CEA. Cabe esperar que los mismos fenómenos van a producirse en los medios biológicos, *in vitro* e *in vivo*. Además, una ligera pérdida de peso observada tras completar el ensayo de hinchamiento en el agua milliQ (Figura 51), indica el posible inicio de la disolución/degradación parcial del material (por parte de CEA), siendo este más expresado en los sistemas no entrecruzados. Por contrario, después de la incubación en PBS se observó un incremento del peso seco residual (Figura 51) que se debe a la incorporación de los cationes presentes en PBS, por los grupos carboxilo ($-COOH$) de las unidades de CEA, siendo sus protones desplazados a la disolución. Eso se confirma con la caída significativa del pH durante el ensayo (Figura 51), proporcional al contenido de CEA (fuente de H^+). Por esta misma razón, durante la incubación en agua miliQ los carboxilos de los materiales protonan el medio liberando sus H^+ y así contribuyen en la disminución del pH causando la acidificación significativa del medio (ya que no se utiliza ningún *buffer*). La comentada acumulación de cationes de sodio y de otros metales por las unidades de CEA también se confirma con altos valores del peso residual a $800^{\circ}C$ mostrados por el PCEA_noX incubada en Sosa y en PBS, en el ensayo termogravimétrico: >40% para Sosa y >50% para PBS, siendo <10% el valor habitual para el homopolímero intacto e incubado en agua milliQ. Los datos de DSC manifestaron que dicha acumulación llega a suprimir completamente la transición vítrea en PCEA_noX, pero no la afecta en los sistemas 90/10_noX.

Swelling in Water (non-crosslinked)



Swelling in Water (crosslinked)

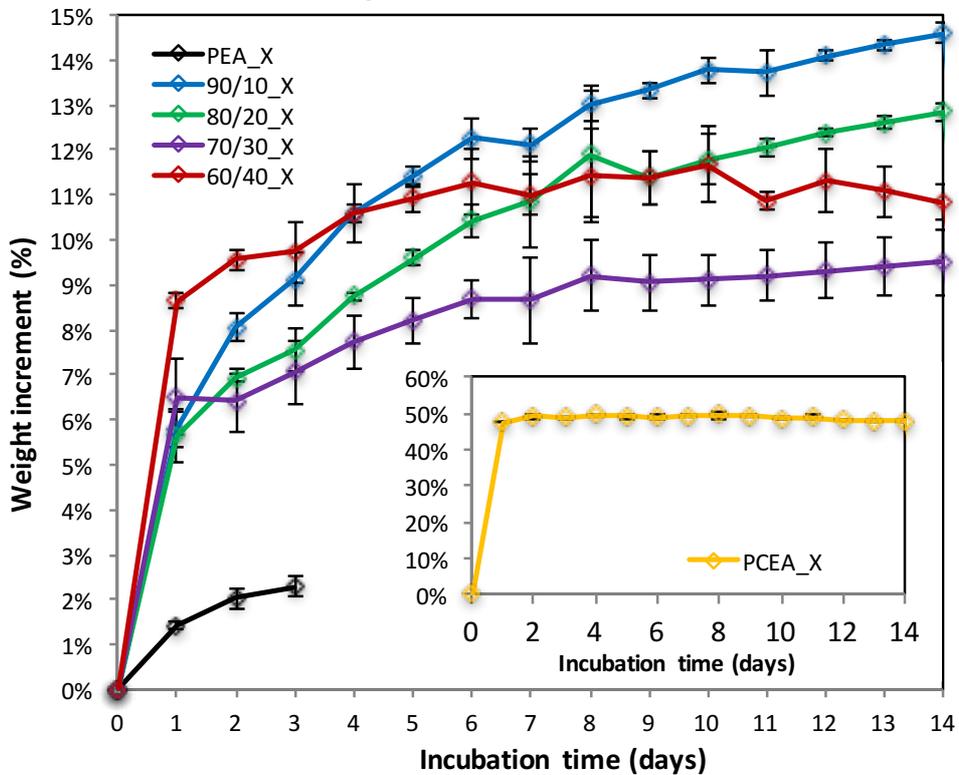


Figura 43. Hinchamiento en agua de los sistemas entrecruzados (abajo) y no entrecruzados (arriba). Insertos: hinchamiento de homopolímero de PCEA.

Tabla 10. Datos sobre hinchamiento de materiales en agua.

| Hinchamiento en Agua (no entrecruzados) | | | | Hinchamiento en Agua (entrecruzados) | | | |
|---|-----------|---------------------|------------------|--------------------------------------|-----------|---------------------|------------------|
| Material | X_{CEA} | Hinchamiento máximo | Tiempo requerido | Material | X_{CEA} | Hinchamiento máximo | Tiempo requerido |
| | % | % | días | | % | % | días |
| PEA_noX | 0.00 | 1.9% | 6 | PEA_X | 0.00 | 2.3% | 3 |
| 90/10 | 0.11 | 76.4% | 14+ | 90/10 | 0.15 | 14.6% | 14 |
| 80/20 | 0.23 | 30.5% | 14+ | 80/20 | 0.25 | 12.8% | 14 |
| 70/30 | 0.27 | 21.4% | 14+ | 70/30 | 0.33 | 9.5% | 14 |
| 60/40 | 0.33 | 15.8% | 14 | 60/40 | 0.40 | 11.7% | 8 |
| PCEA_noX | 1.00 | 2108.60% | 3 | PCEA_X | 1.00 | 49.70% | 8 |

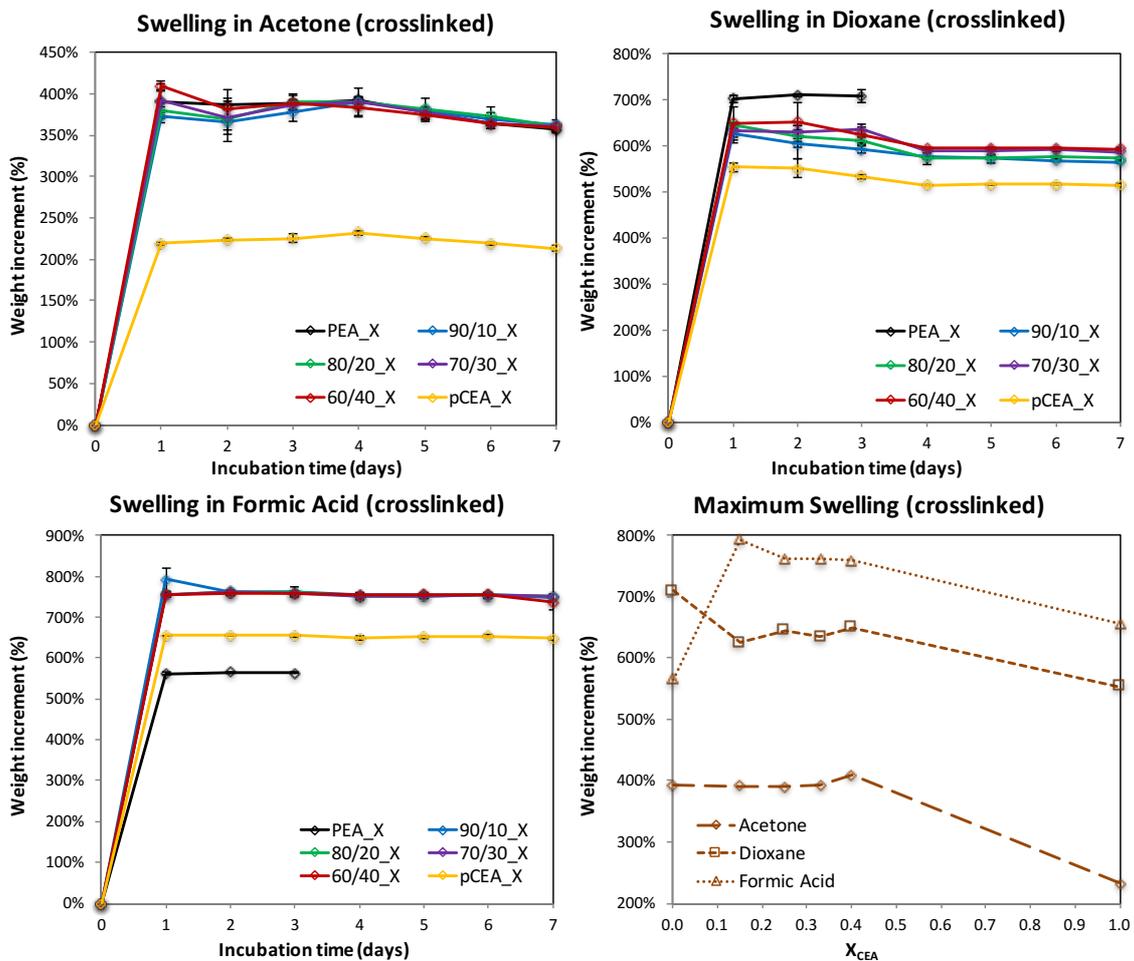


Figura 44. Hinchamiento de los sistemas entrecruzados en Acetona, Dioxano y Ácido Fórmico.

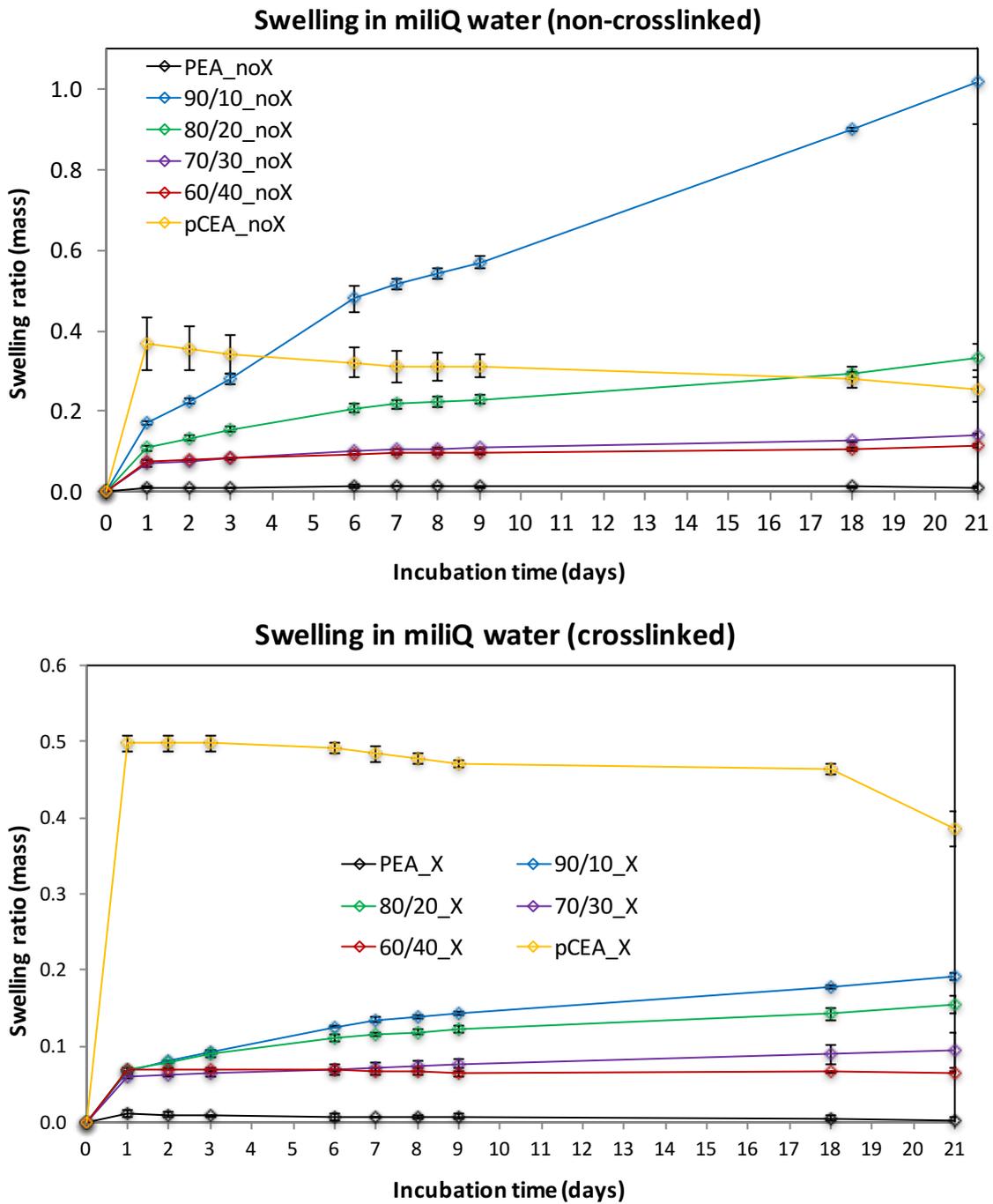


Figura 45. Hinchamiento de los sistemas entrecruzados (abajo) y no entrecruzados (arriba) en Agua miliQ, medido respecto a la masa seca inicial.

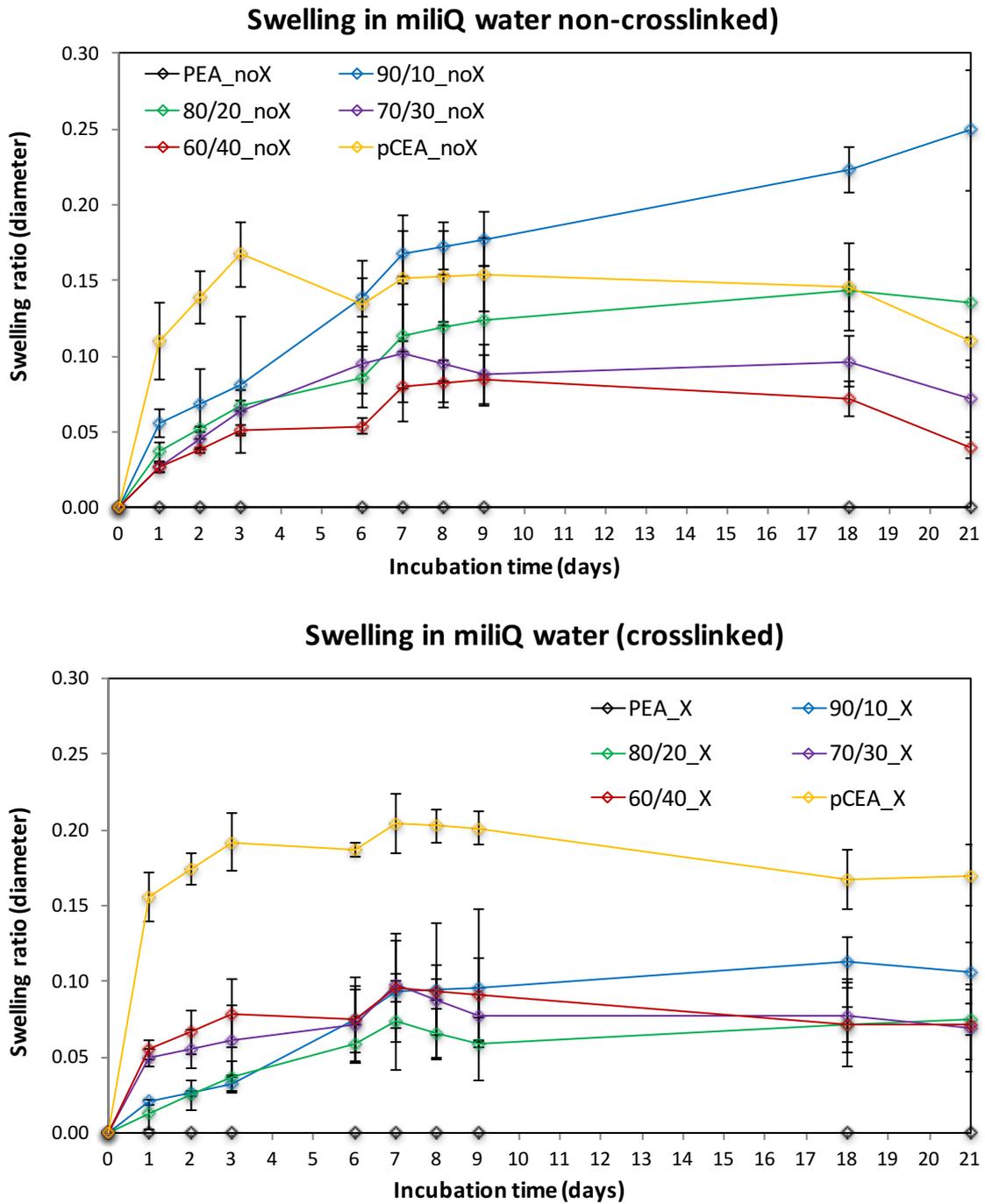


Figura 46. Hinchamiento de los sistemas entrecruzados (abajo) y no entrecruzados (arriba) en Agua miliQ, medido respecto al diámetro seco inicial.

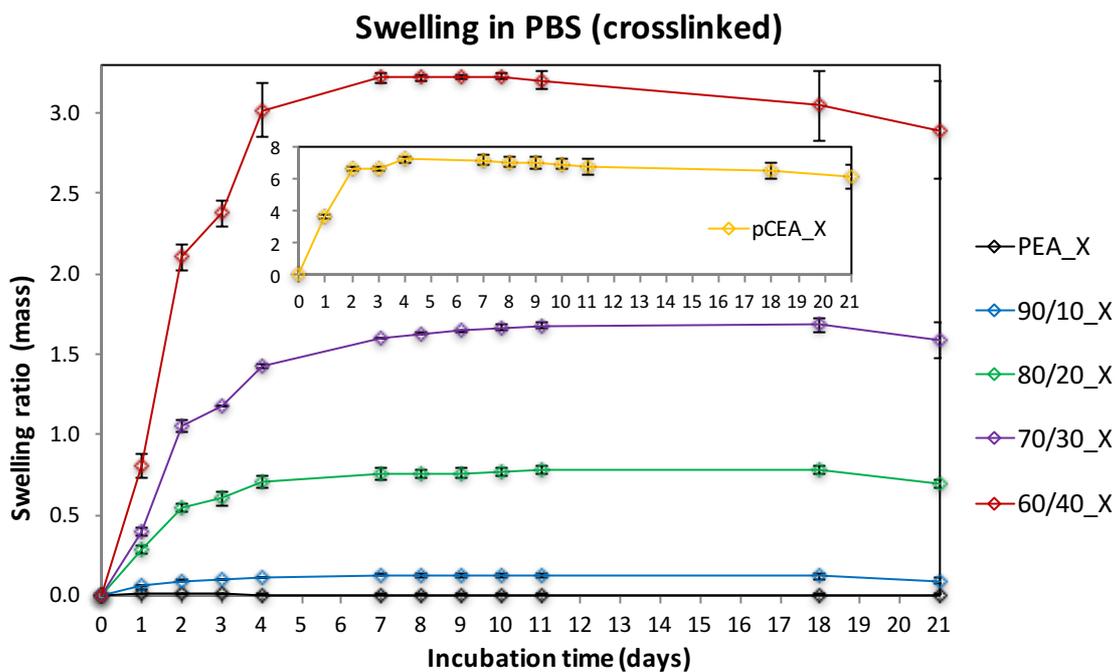
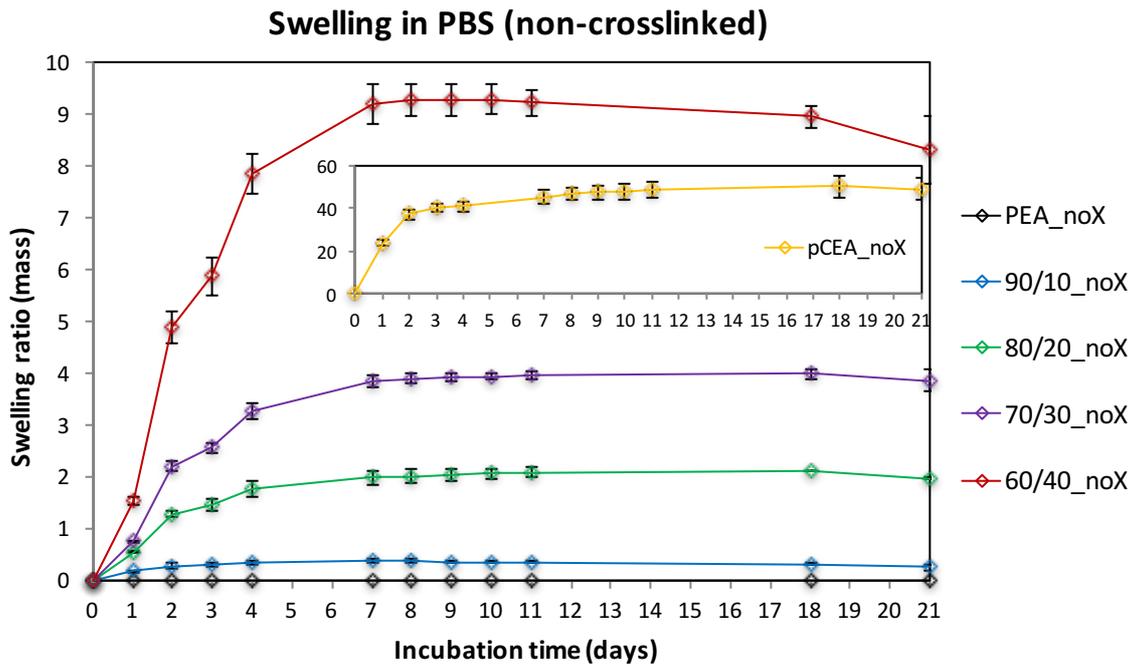


Figura 47. Hinchamiento de los sistemas entrecruzados (abajo) y no entrecruzados (arriba) en PBS, medido respecto a la masa seca inicial.

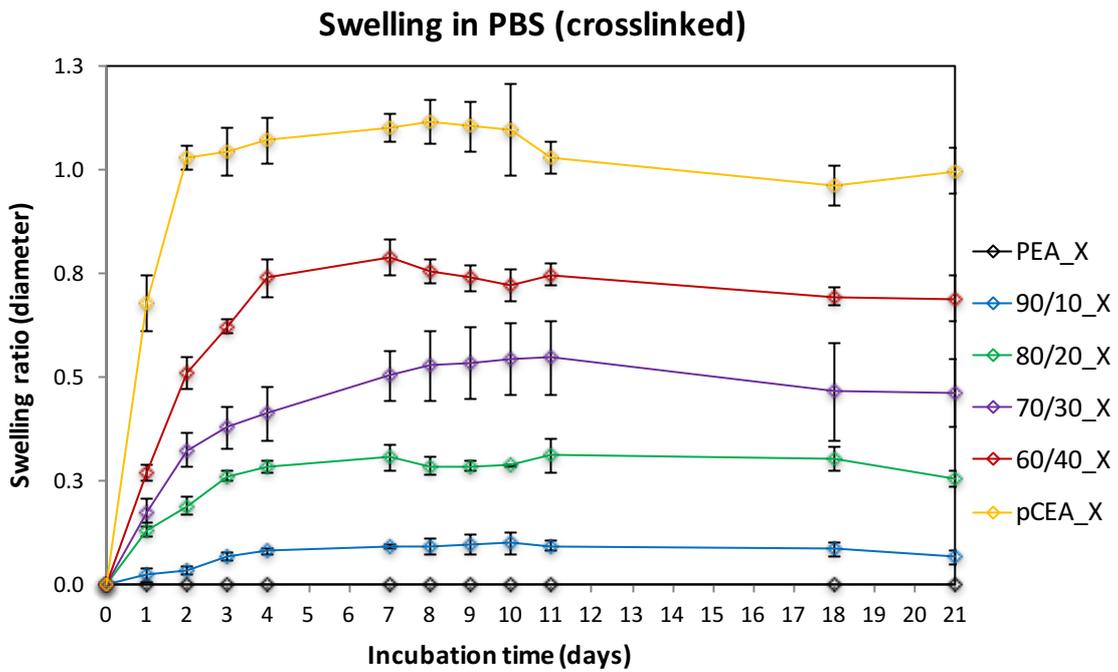
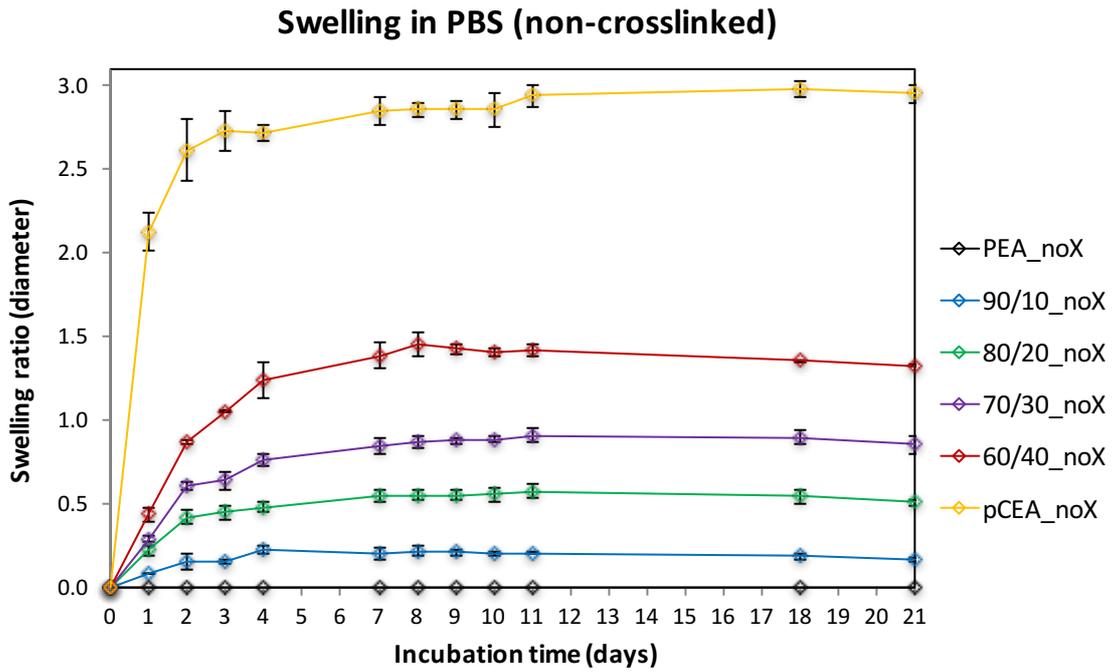


Figura 48. Hinchamiento de los sistemas entrecruzados (abajo) y no entrecruzados (arriba) en PBS, medido respecto al diámetro seco inicial.

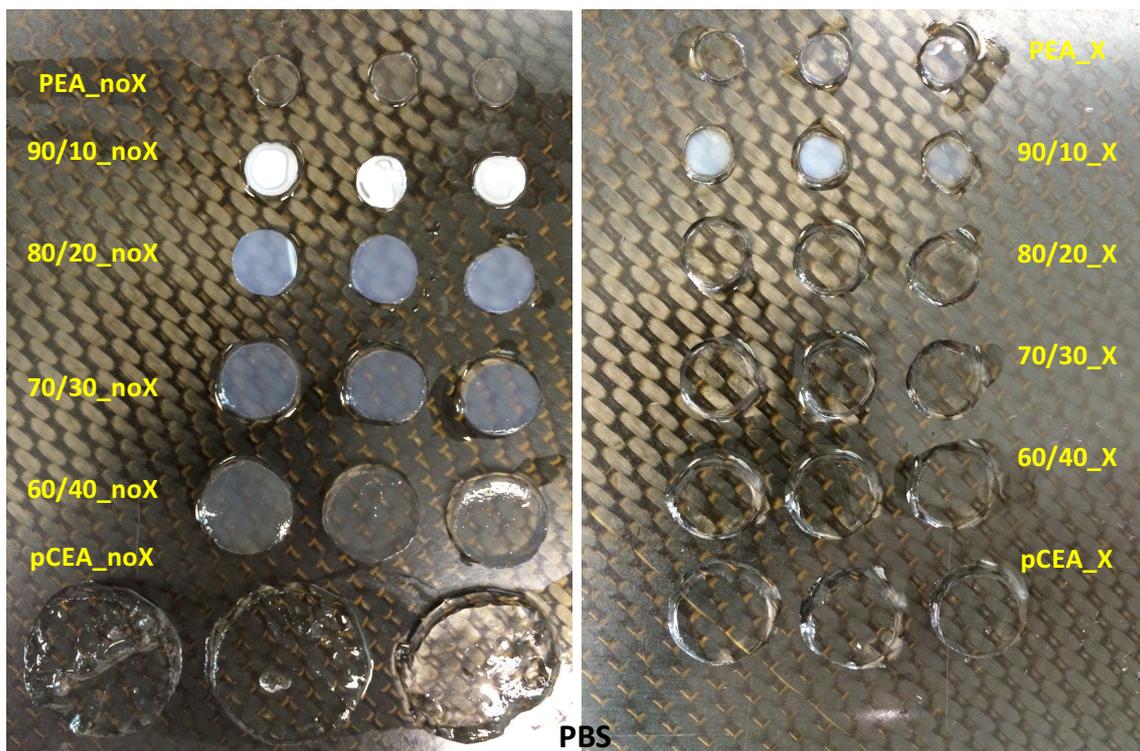
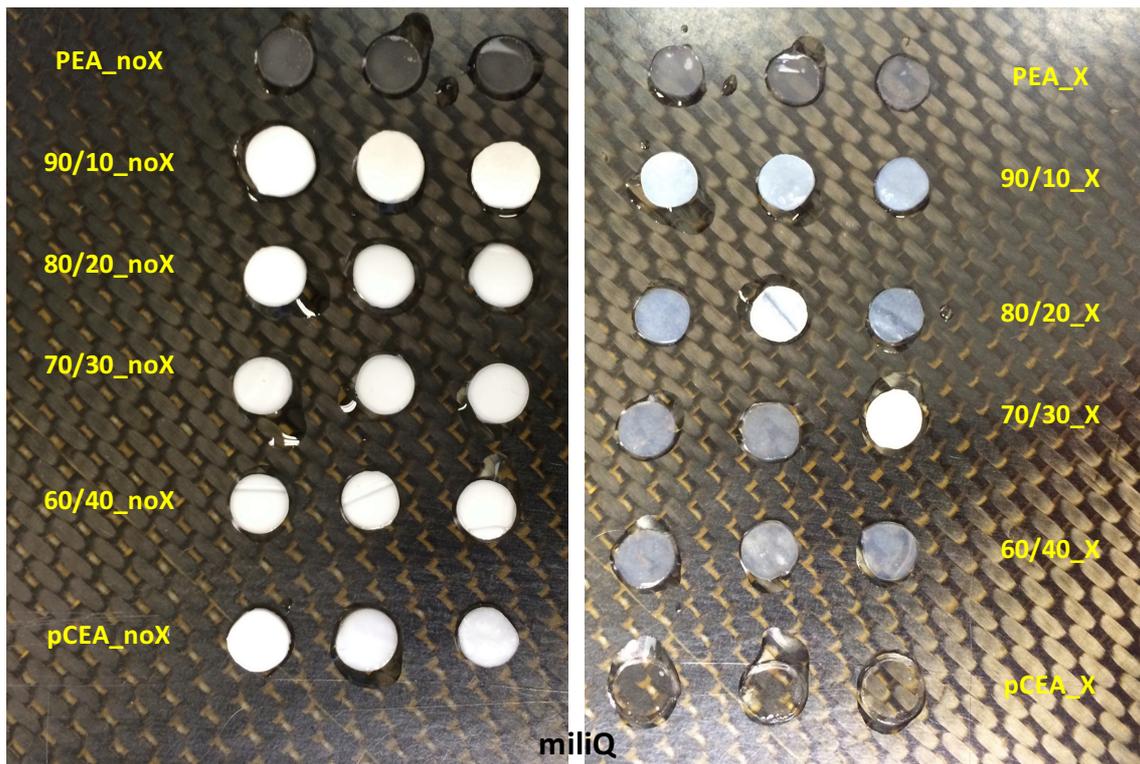


Figura 49. Fotos de muestras hinchadas al terminar el ensayo: en Agua miliQ (arriba) y en PBS (abajo).

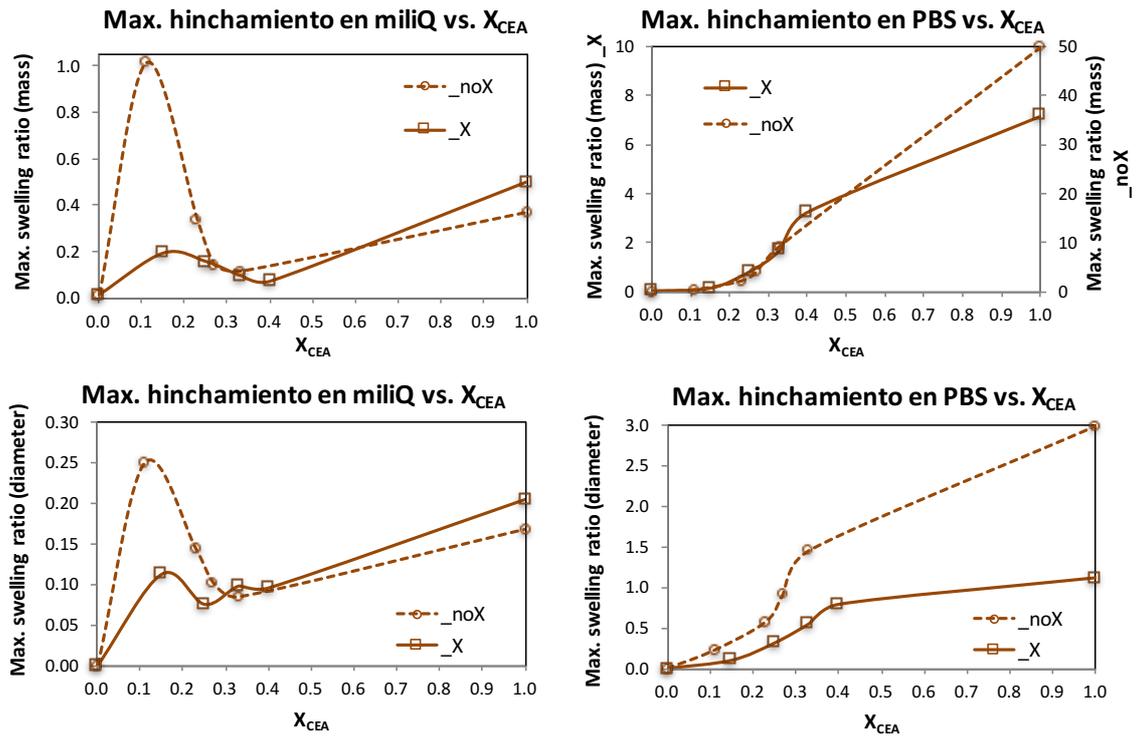


Figura 50. Valores máximos de hinchamiento, medidos respecto tanto a la masa, como al diámetro, de los sistemas entrecruzados y no entrecruzados alcanzadas en agua miliQ y PBS.

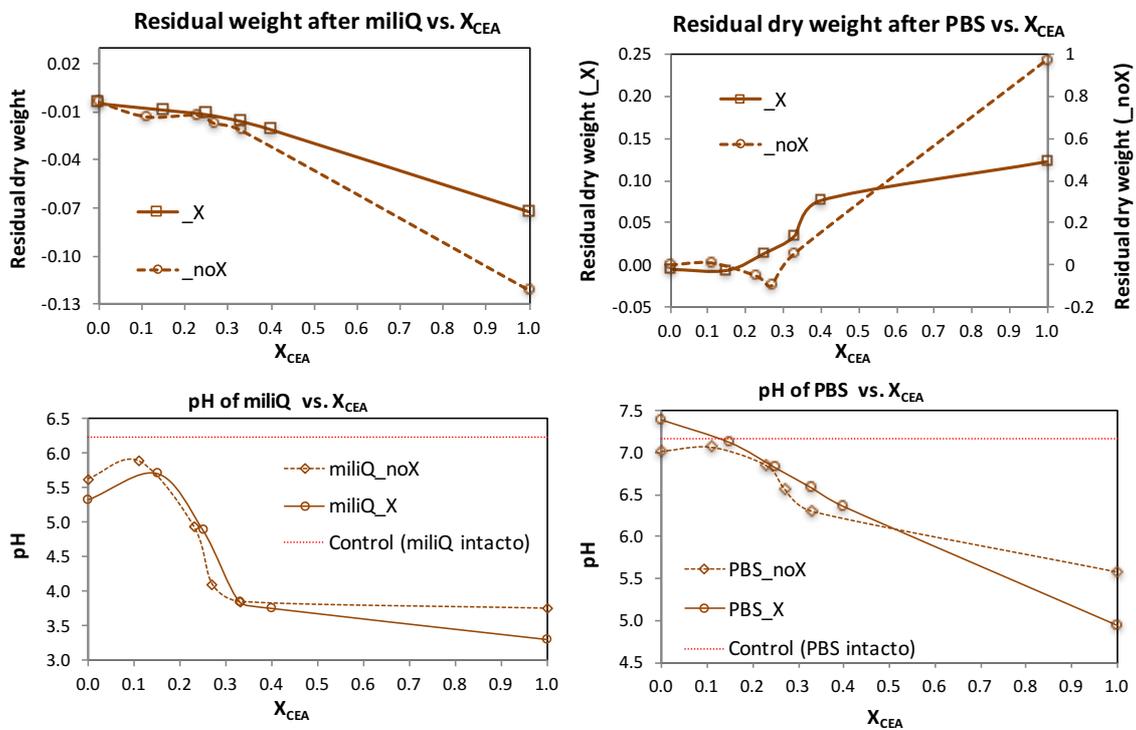


Figura 51. Arriba: Peso seco residual tras realizar el ensayo de 21 días de hinchamiento de los sistemas entrecruzados y no entrecruzados en agua miliQ y PBS. Abajo: pH residual de agua miliQ y PBS en los pocillos tras terminar el ensayo.

El estudio de la mojabilidad de los sistemas producidos mostró la misma tendencia, tanto en el agua como en el dietilenglicol, de disminución del valor del ángulo de contacto para el bajo contenido de CEA y posterior aumento de dicho ángulo con mayor contenido de CEA, siempre devolviendo valores más altos del ángulo en el agua que en el dietilenglicol, por ser agua molécula más polar (Figura 52). Otra vez se observó el fenómeno cuando el comportamiento manifestado por los sistemas copoliméricos no tenía carácter intermedio entre sus respectivos homopolímeros, sobre todo en cuanto a los sistemas no entrecruzados, que está de acuerdo con las explicaciones expuestas en el apartado anterior. Brevemente, con el mayor contenido de CEA, el número creciente de los puentes de hidrógeno que se forman empieza a tener un efecto notable sobre la mojabilidad de los materiales, siendo esta mayor en los sistemas no entrecruzados (a menores valores del ángulo de contacto corresponde mayor mojabilidad).

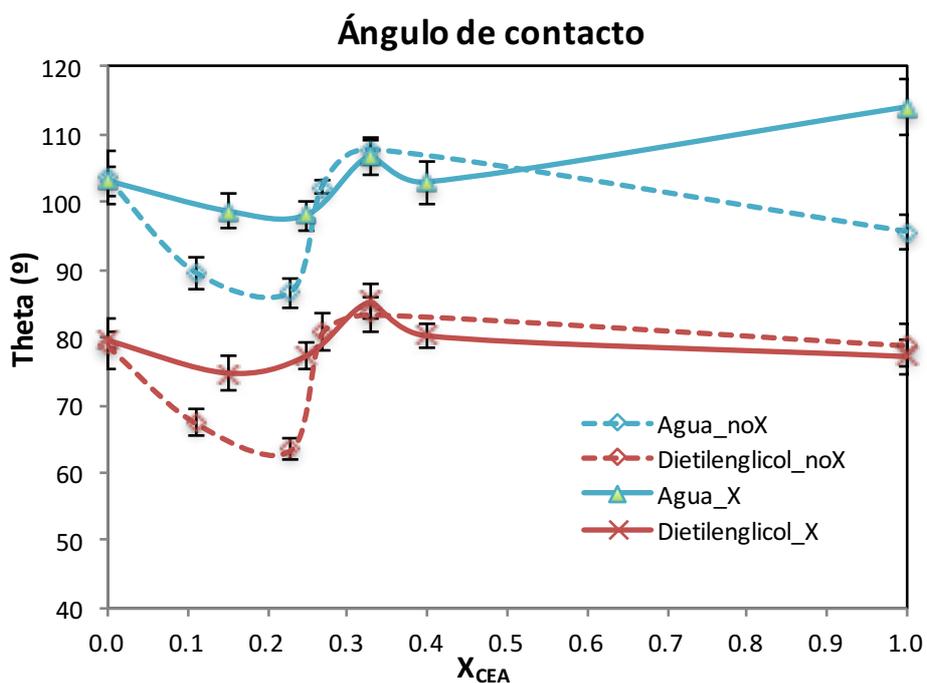


Figura 52. Ángulo de contacto con Agua y Dietilenglicol, medido en los sistemas entrecruzados y no entrecruzados.

5.2.3. Evaluación de la biocompatibilidad de los sistemas producidos

La caracterización biológica ha sido el último paso en la caracterización de los materiales sintetizados, consistiendo en el ensayo de viabilidad y proliferación celular, realizados durante los 1, 3 y 7 días de cultivo directo (Figura 54), y también en toma de las imágenes ilustrando la morfología de los fibroblastos proliferados sobre los materiales (Figura 55).

Considerando la gran capacidad de los materiales de hincharse en el medio acuoso y causar su acidificación, manifestada en la caracterización anterior, se decidió realizar la caracterización biológica para todos los sistemas entrecruzados, y solo para el PEA_noX y el 90/10_noX, en cuanto a los no entrecruzados. Además, se decidió someter todas las muestras al acondicionamiento en el medio de cultivo previo a la siembra, para llevarlos al equilibrio y evitar que su hinchamiento intenso afecte la adhesión o viabilidad celular. Dicho acondicionamiento fue llevado a cabo en las mismas condiciones que el cultivo posterior: en una incubadora celular a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, con los discos en placas de 24 pocillos sumergidos en el medio de cultivo DMEM 1x, sin FBS, pero con glucosa, L-glutamina, piruvato y con rojo fenol como indicador del pH. Tras pasar las primeras 24 horas del acondicionamiento, se detectó la acidificación significativa del medio en los pocillos, con el cambio de su color de rojo a amarillo, manifestando una correlación directa de la intensidad de ese cambio con el contenido de CEA en los materiales, y confirmando otra vez que los grupos carboxilo de CEA protonan el medio de cultivo reduciendo su pH. Con el fin de neutralizar la acidificación observada se hicieron cambios diarios del medio de cultivo durante todo el período de acondicionamiento. Como se puede observar en la Figura 53, con los cambios de medio la intensidad de amarilleo se reducía, hasta desaparecer por completo tras 1 semana de acondicionamiento. Con esto se supone que los H⁺ de los grupos carboxilo fueron sustituidos por los cationes procedentes de sales presentes en el medio de cultivo.

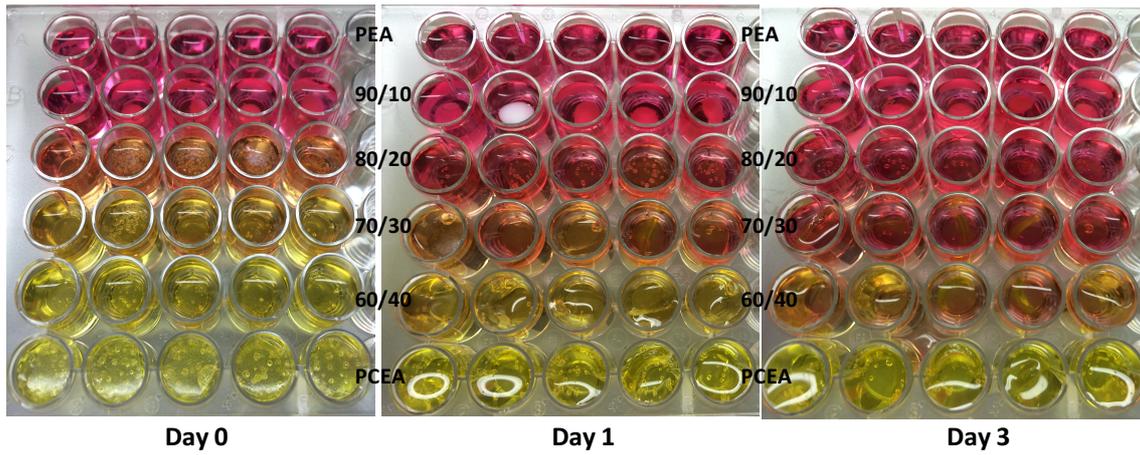


Figura 53. Aspecto general de cambio de pH durante el acondicionamiento de los discos de sistemas entrecruzados en el medio de cultivo.

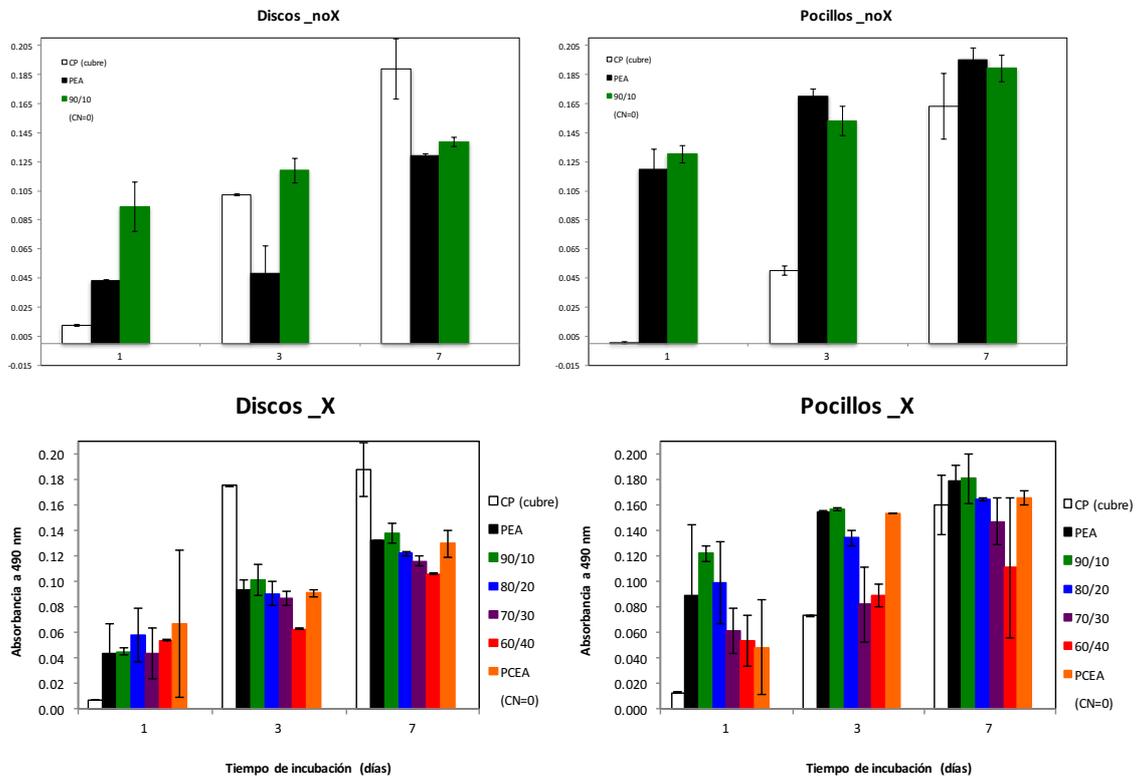


Figura 54. Densidad óptica, medida en el ensayo de MTS para los cultivos de fibroblastos de 1, 3 y 7 días, en los sistemas entrecruzados (abajo) y no entrecruzados (arriba).

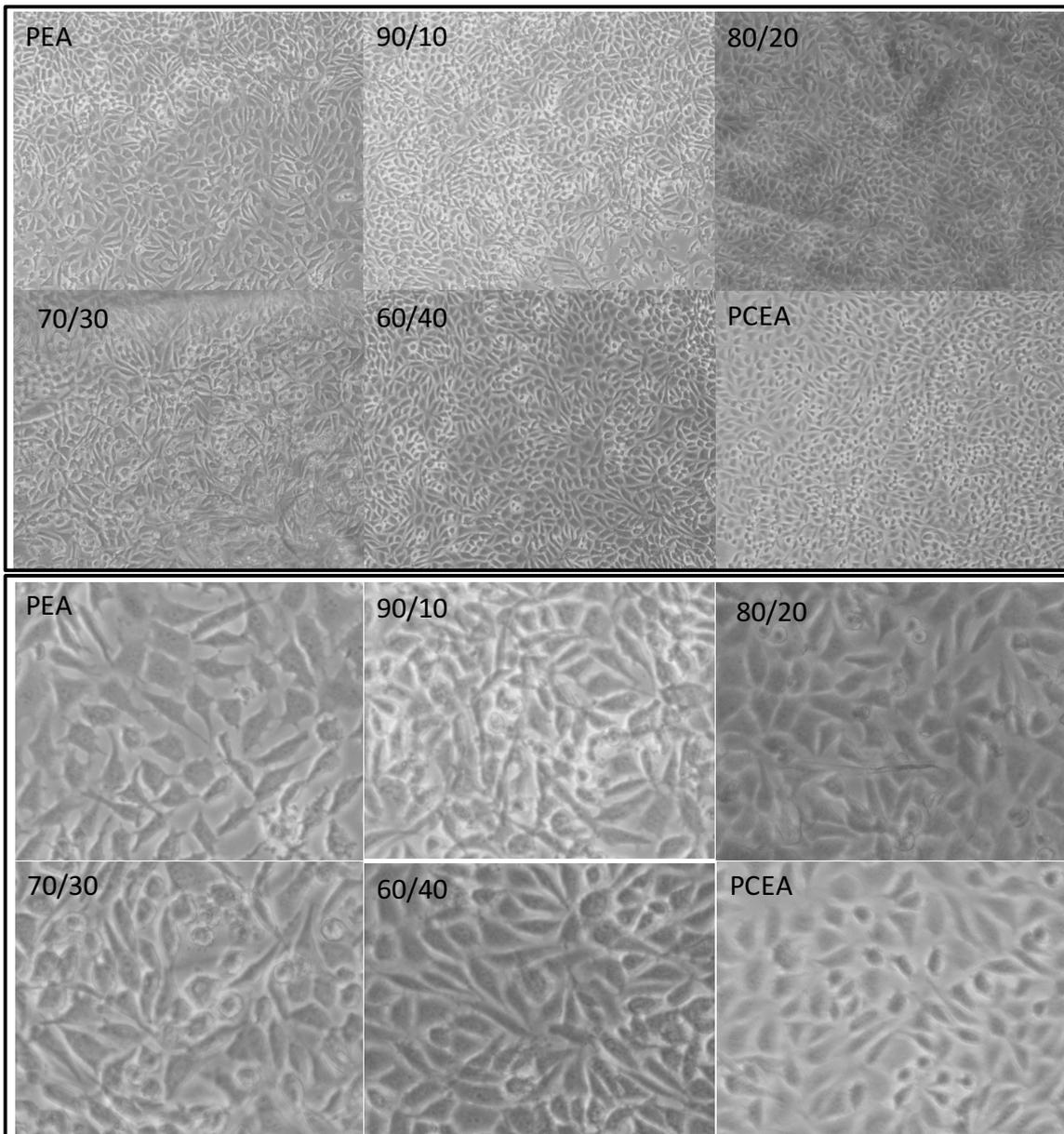


Figura 55. Imágenes de microscopía óptica ilustrando morfología de los fibroblastos tras el cultivo de 1, 3 y 7 días, en los sistemas entrecruzados.

Como se puede comprobar en la Figura 54, durante los 7 días de cultivo se manifestó una clara tendencia de aumento de la densidad óptica (medida como absorbancia a 490 nm) con el tiempo indicando una adecuada viabilidad y proliferación de las células sobre todos los materiales estudiados. La máxima señal mostró el control positivo (CP, cubres de vidrio), y la nula, el control negativo (CN, los discos sin sembrar las células), lo que confirma la validez del ensayo. En cuanto a los sistemas no entrecruzados, los sistemas 90/10 exhibieron una proliferación mayor de fibroblastos que PEA_noX. En cuanto a sistemas entrecruzados, se observaron ciertas diferencias en cuanto a la proliferación celular,

siguiendo la tendencia: 90/10 > PEA y PCEA > 80/20 > 70/30 > 60/40. El menor índice de proliferación en los copolímeros con mayor contenido de CEA (excepto el propio homopolímero, PCEA) observado en los sistemas entrecruzados se explica por el hecho de que la hidrofiliidad del sustrato suele dificultar la adhesión de las células y la posterior colonización del material por ellos [7], [121]. De esta manera, una parte de las células inicialmente sembradas en los discos podría ser eluida en la etapa de adición del medio (y posteriormente, en cada cambio de medio), causando la colonización de los pocillos. Para comprobarlo, después de sacar los discos se hizo el ensayo de MTS adicional en los pocillos donde se incubaban ellos. Efectivamente, se detectó una buena proliferación de fibroblastos en todos los pocillos, lo que además confirma el carácter no citotóxico de los sistemas estudiados (Figura 54).

Tras 7 días de cultivo, antes de proceder al último ensayo de MTS, los discos fueron observados con un microscopio óptico y se tomaron las fotos para estimar la colonización de los materiales y la morfología celular adquirida por los fibroblastos en ellos. Se manifestó (Figura 55) una buena colonización de todos los materiales, llegando al máximo en la muestra 90/10_X. También se detectó que la mayor parte de células adquirieron una morfología expandida que corresponde a un fibroblasto correctamente adherido y diferenciado, mostrando el mejor resultado en PEA_X, como era de esperar; sin embargo, cierta parte de células, sobre todo en copolímeros con alto contenido de CEA, mantuvieron la morfología redondeada que no es apropiada para un fibroblasto diferenciado y que puede ser explicado por un carácter altamente hidrófilo de estos sistemas que afecta la adhesión celular [52], [122].

5.3. CONCLUSIONES PARCIALES

Se han establecido las condiciones óptimas de polimerización en UV para producir los respectivos sistemas copoliméricos, tanto entrecruzados como no entrecruzados. El CEA resulta ser totalmente compatible y copolimerizable con el EA tras aplicar el pre-tratamiento en UV de 1h sobre el EA. En cuanto a las propiedades macroscópicas y morfología, los materiales producidos han sido uniformes, transparentes, dúctiles y manipulables.

Se han caracterizado las propiedades físico-químicas de todos los copolímeros producidos, determinando la efectividad de la reacción, la composición real de los materiales, la estructura de fase, las propiedades mecánicas y el grado de hidrofiliidad. Los copolímeros no entrecruzados resultaron ser bifásicos, con una fase mayoritaria de elevada miscibilidad entre unidades de EA y CEA (potenciada por el entrecruzamiento que impidió la segregación de sus dominios) y la otra fase, minoritaria, formada en casi toda su totalidad con los dominios de EA. Esta estructura bifásica se refleja bien en el comportamiento del volumen específico, las termogramas de calorimetría, transición vítrea y capacidad calorífica de los materiales no entrecruzados y en el comportamiento de la tangente del ángulo de pérdidas en las termogramas del ensayo dinamo-mecánico.

La incorporación de unidades de CEA, aporta propiedades nuevas al PEA, como la hidrofiliidad, lo que permite esperar un correspondiente aumento de biodegradabilidad de sus sistemas combinados, y la funcionalizabilidad, que abre la posibilidad de enlazarlos covalentemente con el HA. Entre otras propiedades adquiridas se destaca la capacidad de formar puentes de hidrógeno. Los puentes de hidrógeno formados por los grupos carboxilo de CEA afectan al amplio espectro de propiedades físico-químicas de los materiales producidos. Sin embargo, el entrecruzamiento disminuye la cantidad de puentes de hidrógeno capaces de formarse en los sistemas, mientras que los copolímeros no entrecruzados, al no ser una mezcla tan homogénea, manifiestan mayor capacidad de formarlos.

Los cultivos celulares realizados sobre la mayoría de los sistemas producidos (tras su previo acondicionamiento) han demostrado buena adhesión y proliferación celular, igual que la ausencia de efectos citotóxicos. Por lo tanto, dichos materiales son biocompatibles y aptos para

diseñar y fabricar andamiajes a su base con destino para la ingeniería tisular.

Particularmente, el copolímero 90/10 no entrecruzado (90/10_noX) parece ser un candidato idóneo para sustituir el PEA en la producción de sistemas combinados con el ácido hialurónico (HA), aprovechando el ácido fórmico (FA) como su disolvente común, ya en forma de *films* de *solvent casting* o membranas hiladas de *electrospinning*. Entre las propiedades favorables que destacan este copolímero frente a otros, con mayor contenido de CEA, son:

- (a) hinchamiento moderado en PBS y en medio de cultivo;
- (b) no acidificación del medio;
- (c) buena proliferación de los fibroblastos L929 (mejor que la exhibida por el PEA_noX).

Por otro lado, los sistemas entrecruzados, además de su posible uso como biomateriales *per se*, presentan interés para la producción de *semi-IPNs* con el HA, dado el alto grado de hinchamiento de P(EA-co-CEA)_X en el FA.

CAPÍTULO 6. SISTEMAS COMBINADOS HA-P(EA-co-CEA)

6.1. INTRODUCCIÓN

La alta reactividad de las unidades de CEA junto con su enorme capacidad de formar los puentes de hidrógeno y todas las propiedades derivadas de estas, estudiadas al fondo en el Capítulo 5, permiten esperar que el copolímero no entrecruzado P(EA-co-CEA), de proporción másica PEA/CEA = 90/10 (a continuación, llamado 'Copolímero'), será idóneo para sustituir el PEA puro en los sistemas híbridos HA-PEA. Se puede esperar que, en los nuevos sistemas híbridos, los numerosos grupos reactivos conferidos por CEA producirán las interacciones no-covalentes con los grupos presentes en el ácido hialurónico, aumentando la estabilidad y mejorando otras propiedades de los sistemas, y así ayudando a resolver las deficiencias descubiertas en los sistemas HA-PEA.

El primer paso en la creación de tales sistemas mejorados, llamados a continuación 'HA-Copolímero', consistirá en la producción y caracterización de los *films* HA-Copolímero de la misma composición nominal que los *films* de HA-PEA, es decir, 70/30, 50/50 y 30/70. A base de los resultados obtenidos se podrá concluir sobre otros tipos posibles de sistemas híbridos HA-Copolímeros y determinar las condiciones de su producción.

6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.2.1. Producción de los *films* HA-P(EA-co-CEA) mediante la técnica de *solvent casting*.

Previamente, fueron preparadas las soluciones de HA y Copolímero en el ácido fórmico (FA). La solución HA_FA fue preparada a concentración 2,5 w/v% del ácido hialurónico. El Copolímero mostró una solubilidad deficiente en FA comparando con PEA, exhibiendo a concentración 5 w/v% un hinchamiento intenso y posteriormente una desintegración parcial sin llegar a una disolución completa. Para resolver el problema de solubilidad, fue añadido una cantidad adicional del solvente, FA, bajando de esta manera la concentración del Copolímero a 3.5 w/v%, y fue aplicado un calentamiento a 60°C, junto con una agitación magnética intensa durante *overnight*, tras lo cual se consiguió la disolución completa del copolímero. Posteriormente, las soluciones HA_FA y Copolímero_FA fueron mezcladas en proporciones determinadas estequiometricamente, y sometidas a una agitación magnética conjunta durante 30 minutos, seguida por el *solvent casting* a partir de cada mezcla. Las soluciones puras de HA y Copolímero en FA también fueron sometidos a *solvent casting*, con el fin de utilizar los *films* producidos a partir de ellas como control en la caracterización posterior.

El *solvent casting* en principio fue realizado en las condiciones iguales a la obtención de los *films* HA-PEA, descritas en el Capítulo 4, pero manifestó complicaciones importantes. A las 48 horas de evaporación del ácido fórmico a temperatura ambiente, su intensidad fue muy baja, dejando cantidades residuales significativas del FA en las placas de teflón y ralentizando el proceso considerablemente. El progreso de evaporación a las 72 horas aún tenía carácter deficiente, por lo que se decidió acelerarlo aplicando un calentamiento a 60°C + vacío. En estas condiciones, en 3 horas todo el FA residual se vio evaporado dejando los *films* en estado relativamente seco, aunque con un intenso olor a FA, indicando la presencia de ciertas cantidades de FA atrapadas entre las cadenas de HA y Copolímero. Después de un desecado adicional a 40°C durante varios días, el olor característico a FA fue eliminado y se procedió a caracterizar los materiales producidos. Por otro lado, cabe destacar que la aplicación de vacío durante el *solvent casting* afectó en la morfología de los *films*, causando aparición de ciertas imperfecciones, como agujeros, pérdidas de integridad o un relieve complicado en la superficie.

6.2.2. Caracterización físico-química de los *films* producidos.

Los espectros de FTIR (Figura 56) revelan la presencia en los *films* HA-Copolímero de los grupos que provienen tanto del HA (enumeradas en el Capítulo 4), como del Copolímero (enumeradas en el Capítulo 5), que indica la combinación indudable de las dos fases durante *solvent casting*. Las termogramas de la masa residual y de la derivada de la pérdida de masa, representadas en la Figura 57 (arriba) también revelan un comportamiento combinado de los *films* en cuanto a su degradación térmica, exhibiendo ellos perfiles intermedios entre HA y Copolímero puros. Asimismo, se detecta la influencia mutua entre las dos fases, como un ligero desplazamiento de los picos correspondientes a la degradación de fase HA a temperaturas más altas, y los correspondientes a la degradación de fase PEA, a temperaturas más bajas. Sin embargo, los *films* se manifestaron muy heterogéneos en cuanto a su composición actual, que se desviaba mucho de la nominal (Figura 57, abajo), sobre todo en los *blends* 70/30, donde el contenido real de HA era significativamente menor de 70wt.%. Eso se debe a larga duración del *solvent casting*, durante el cual las fases, aprovechando su movilidad en estado líquido se separaron considerablemente, a continuación, dando lugar a las zonas más ricas en HA, con carácter más vítreo y rigidez por encima de la media, y otras, más ricas en Copolímero, con carácter más gomoso y rigidez por debajo de la media.

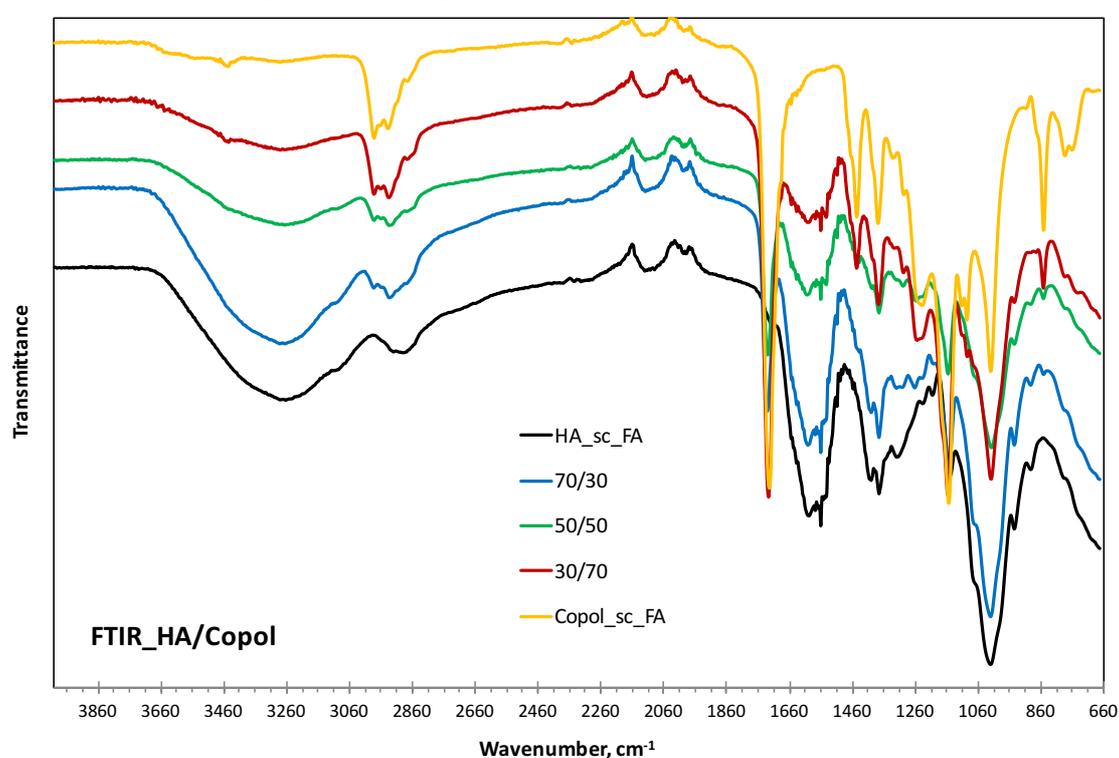


Figura 56. Espectros de FTIR de los *films* HA-Copolímero, producidos vía solvent casting.

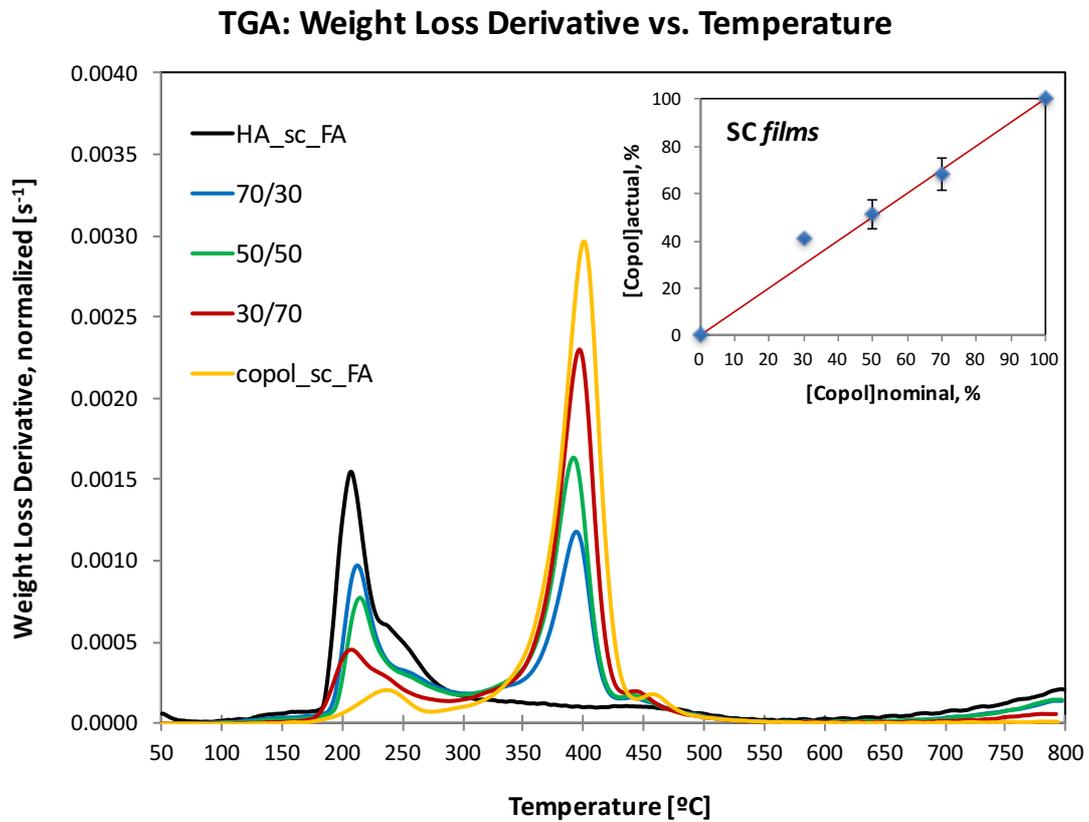
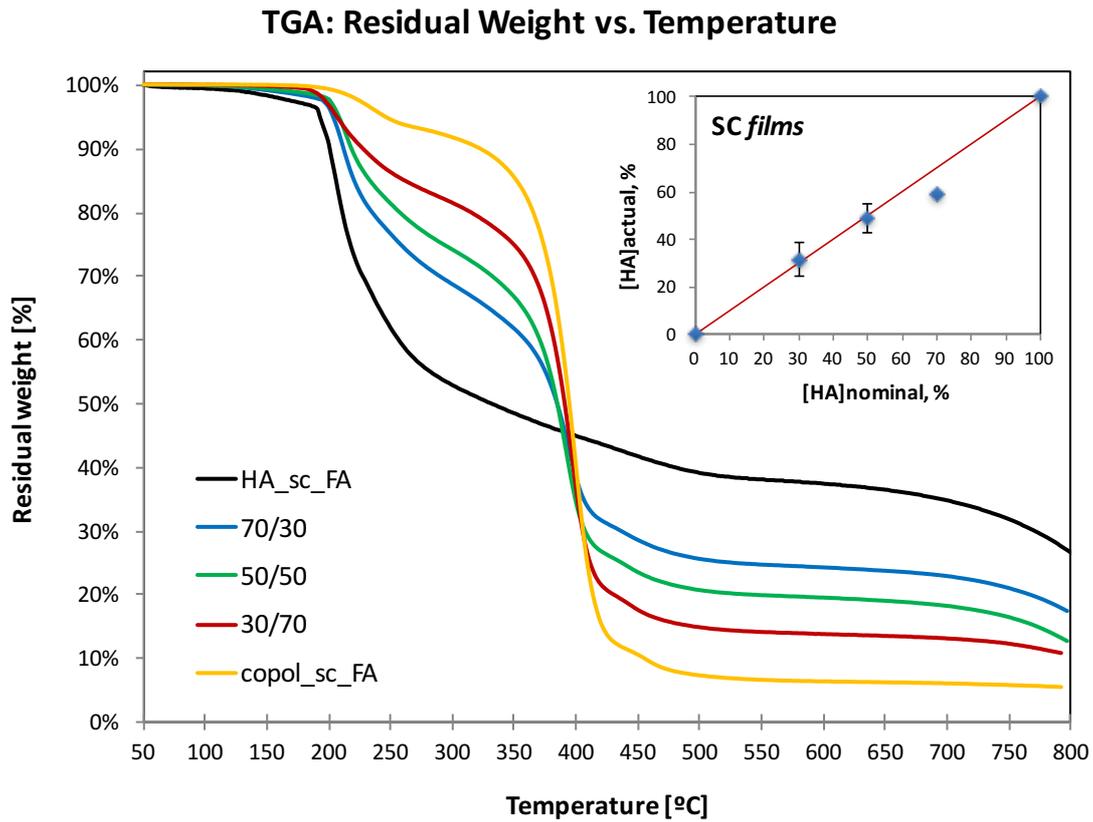


Figura 57. Termogramas de TGA y composición actual frente a nominal de los *films* HA-Copolímero.

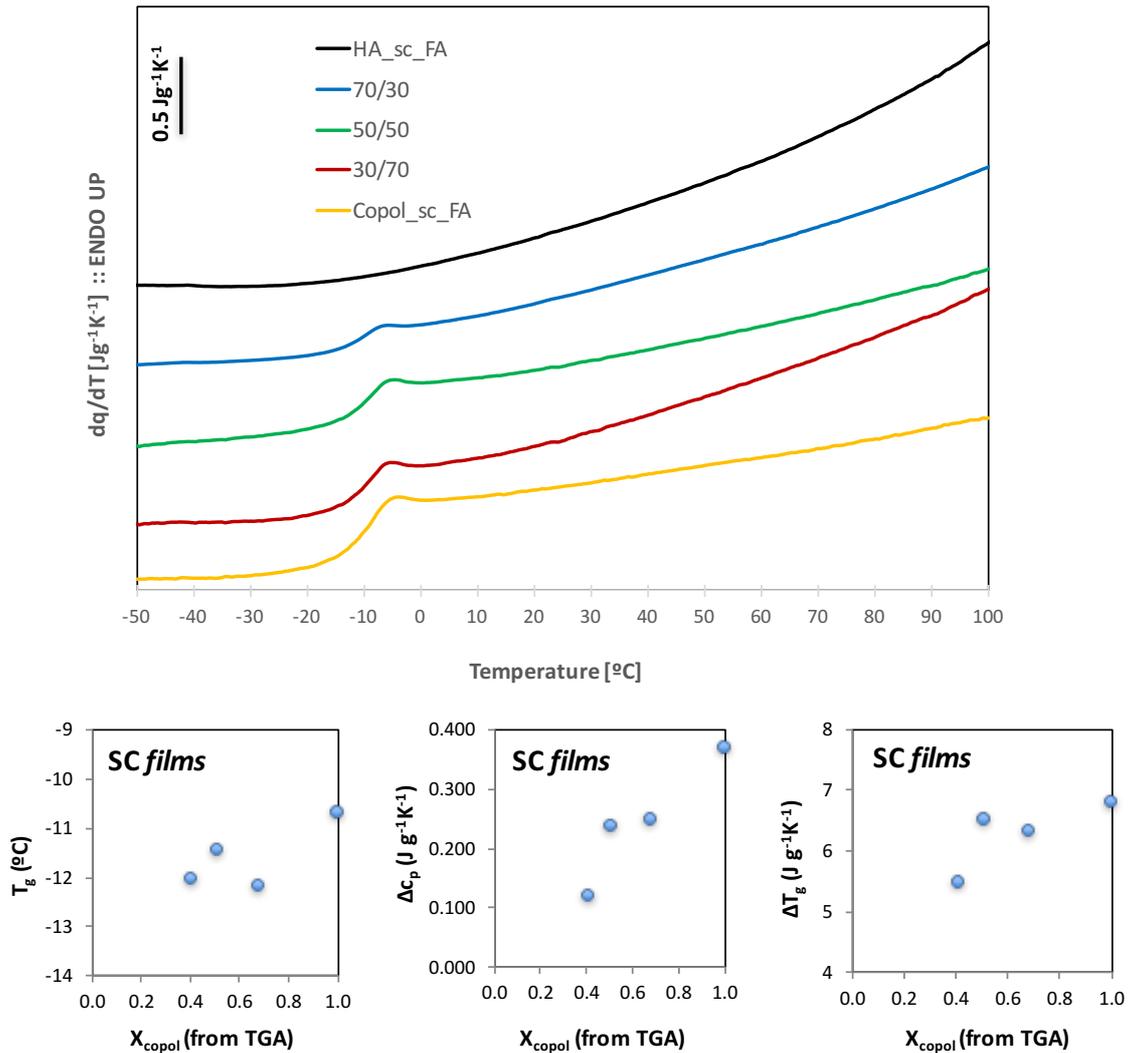


Figura 58. Termogramas de DSC (arriba) y algunos parámetros de la transición vítrea (abajo) de los *films* HA-Copolímero.

Las termogramas de DSC muestran varios fenómenos interesantes en cuanto al carácter de la transición vítrea de la fase Copolímero en los *films* Figura 58. En principio, la presencia y cantidad de HA en materiales no afecta a la temperatura de inicio de la transición (T_{onset}); sin embargo, los valores de T_g varían entre las muestras, siendo en general más altas con un alto contenido de Copolímero. Los valores de ΔT_g experimentan un incremento más sustancial con el contenido de Copolímero, igual que los valores de Δc_p . Todo esto puede indicar la existencia de cierta interacción entre las unidades de HA y Copolímero, lo que no se observaba en los híbridos HA-PEA. Para confirmar los fenómenos revelados por DSC, se hizo un DMTA de los *films*, cuyos resultados se exponen en la Figura 59.

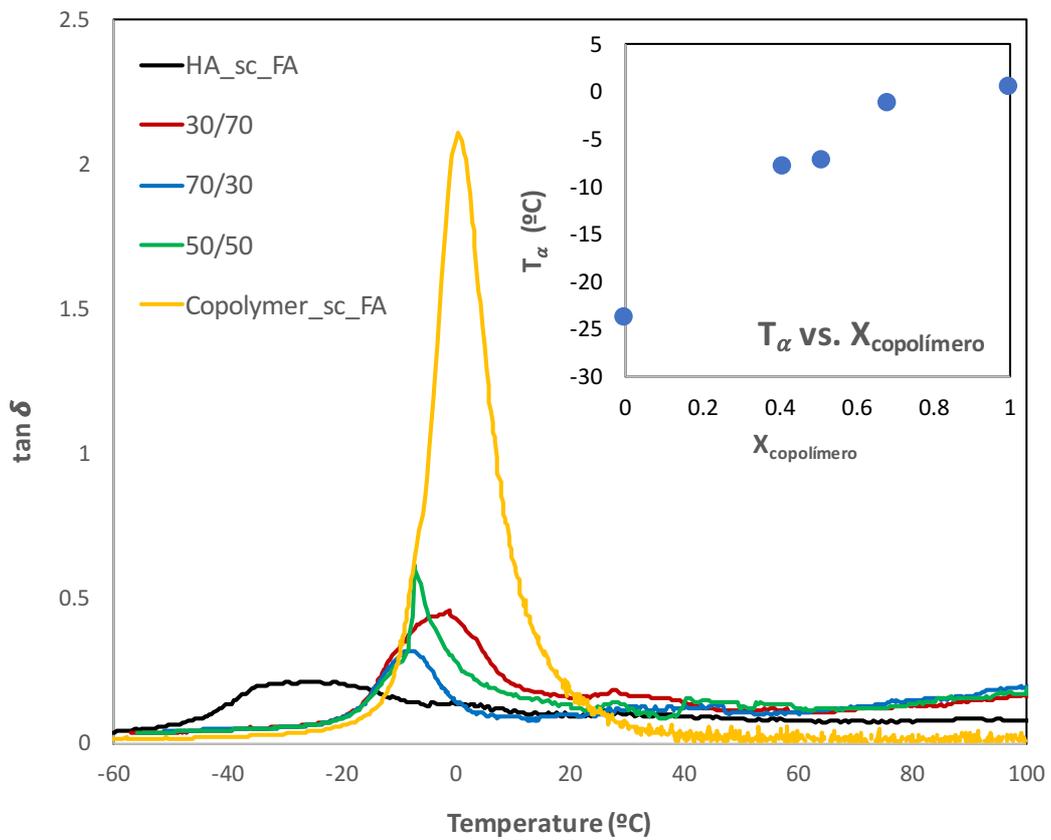
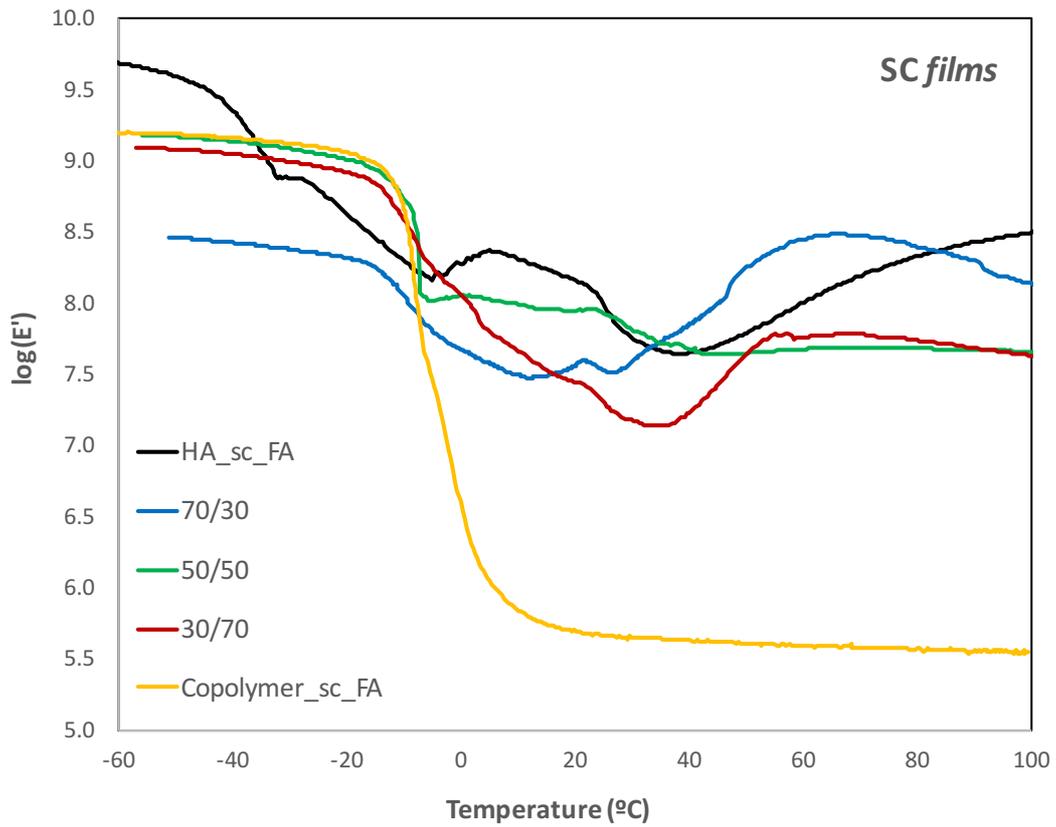


Figura 59. Termogramas del módulo de almacenamiento, E' , (arriba) y del tangente del ángulo de pérdidas, $\tan \delta$ (abajo) obtenidos en DMTA de los *films* HA-Copolimero. Inserto: valores de T_{α} respecto a $X_{\text{copolimero}}$.

Las termogramas del módulo de almacenamiento, E' , exhiben un conjunto de fenómenos interesantes que ocurren en los materiales durante su calentamiento de -60°C a $+100^{\circ}\text{C}$, después de ser enfriadas con ayuda de los vapores del nitrógeno líquido. Partiendo de valores típicos del módulo vítreo, de entre 10^9 y 10^{10} Pa, salvo en la muestra 50/50 que la tiene en torno de $10^{8.5}$ Pa, el módulo en los *films* no sufre variaciones importantes hasta llegar a la relajación principal asociada a la transición vítrea de la fase del Copolímero. Cabe destacar que la caída de E' experimentada entonces por los *films* HA-Copolímero es mucho menos pronunciada que en los correspondientes *films* de HA-PEA, lo que también es índice de una posible interacción intrínseca entre las fases de HA y Copolímero. Un incremento importante de los valores del módulo a partir de los $+30^{\circ}\text{C}$ observados en los *films* 70/30 y 30/70, se debe a la recuperación del estado vítreo de la fase HA por su simple desecación con la temperatura, y sirve de prueba sólida de la continuidad que tiene la fase HA en estos sistemas combinados. En el sistema 70/30, el módulo a partir de $+48^{\circ}\text{C}$ incluso llega a superar su valor de vidrio inicial. En el sistema 50/50 la correspondiente estabilización del módulo tiene forma de un plateau exhibido entre -5°C y $+26^{\circ}\text{C}$ y posteriormente, a partir de $+45^{\circ}\text{C}$, mostrando un comportamiento similar a el del sistema de HA puro, pero sin experimentar el incremento posterior del E' con temperatura. Por otro lado, el valor del módulo en el Copolímero puro sigue cayendo significativamente durante la relajación principal de sus unidades hasta los $+20^{\circ}\text{C}$ y después exhibe un ligero descenso, mostrando el estado típico de goma del material. Otra tendencia que cabe destacar, es desplazamiento de los valores de T_{α} , observados en las termogramas del tangente de δ , a temperaturas mayores con aumento del contenido de Copolímero en los *films* (Figura 59, inserto).

Los sistemas combinados HA-Copolímero de la composición 70/30, 50/50 y 30/70 fueron sometidos al mismo ensayo de citotoxicidad con extractos que los sistemas combinados HA-PEA descritos en el Capítulo 4. Sin embargo, durante la realización de este ensayo se detectó una fuerte acidificación del medio de cultivo, con un cambio intensivo de su coloración, que confirma otra vez la retención de las cantidades residuales del ácido fórmico por la matriz de HA y Copolímero con ayuda de numerosos puentes de hidrógeno que forman ellos. Esta vez la fuerza de la retención de FA, debida más a la fase Copolímero, fue más significativa, ya que la acción conjunta de vacío + 60°C no pudo eliminarla de los materiales. Consecutivamente, su liberación en el medio de cultivo causó un efecto citotóxico sobre los fibroblastos, reduciendo la viabilidad celular en los pocillos por debajo del umbral de 70% respecto al blanco, aunque menos grave que la citotoxicidad causada por extracto de látex (Figura 60).

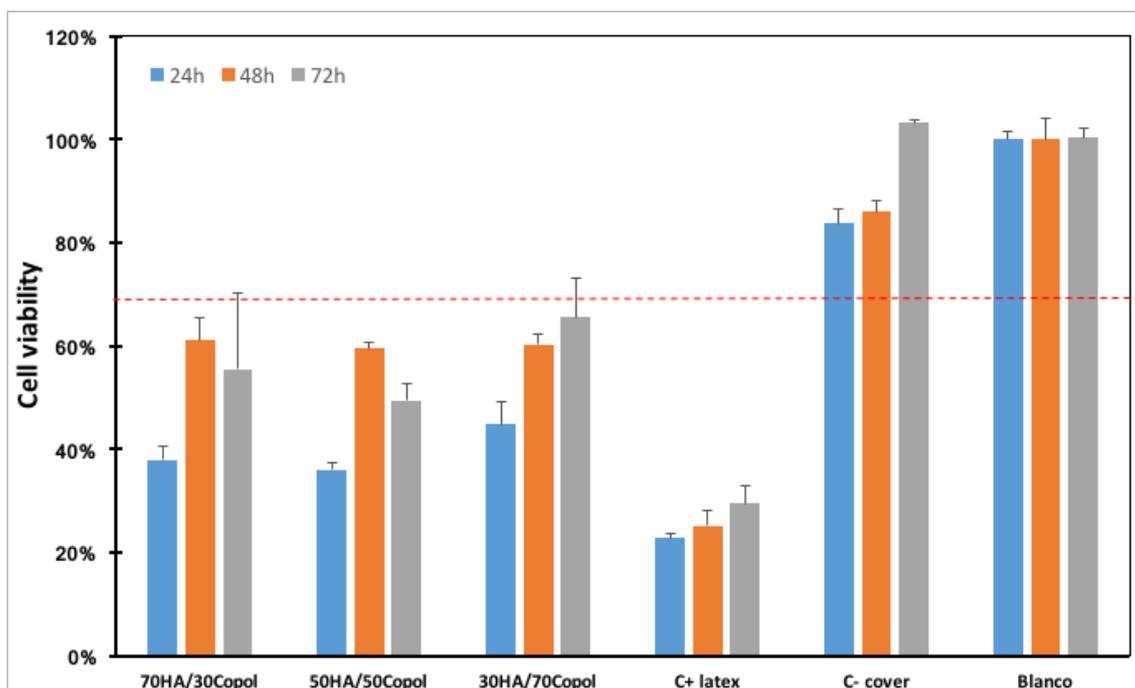


Figura 60. Viabilidad celular determinada en el ensayo de citotoxicidad con los extractos de los *films* HA-Copolímero, obtenidos vía *solvent casting*.

6.3. CONCLUSIONES PARCIALES

Los *blends* HA-P(EA-co-CEA) son un nuevo tipo de sistemas combinados a base del HA y presentan diferencias significativas en comparación con los *blends* HA-PEA. Un grado más alto de la interacción entre ambas fases conseguido en estos sistemas, abre la posibilidad de obtener un producto más estable y compatible, que carezca de las deficiencias mostradas por los sistemas HA-PEA. Sin embargo, para cumplir este objetivo, antes hace falta conseguir una distribución uniforme y bien aleatoria de las dos fases, HA y Copolímero, en sus *films* obtenidos vía *solvent casting* desde sus respectivas soluciones en el ácido fórmico.

Por otro lado, cabe resumir que las pruebas llevadas a cabo con los sistemas HA-PEA y HA-Copolímero utilizando FA como disolvente común, revelaron ciertas propiedades muy importantes del ácido fórmico que pueden considerarse desventajosas en este caso [119]. Su baja volatilidad (alta temperatura de ebullición y baja velocidad de evaporación) y su capacidad de formar los puentes de hidrógeno potencian su retención en la matriz polimérica y complican su eliminación, entre otras consecuencias, bajando el rendimiento de *solvent casting* y requiriendo llevar a cabo un post-tratamiento de los materiales con temperatura y vacío. Además, los grupos carboxilo de FA compiten con los carboxilos de HA y CEA como sustrato para el DEO, agente entrecruzador que funciona en el medio ácido, reduciendo considerablemente la eficacia de la reticulación HA-HA y HA-Copolímero, requerida para aumentar la estabilidad de estos sistemas para sus aplicaciones *in vivo*. La resolución de estos problemas metodológicos permitirá un uso eficaz de los sistemas desarrollados en este trabajo, como biomateriales para ingeniería tisular.

CAPÍTULO 7. CONSIDERACIONES FINALES

7.1. CONCLUSIONES GENERALES

El ácido fórmico (FA) es un disolvente común para el ácido hialurónico (HA) y el poliacrilato de etilo (PEA). Tratamiento con FA no causa modificación química de los dos polímeros ni liberación de sustancias citotóxicas en ellos.

Empleando FA, se consigue compatibilizar HA con PEA y, a partir de sus mezclas (*blends*) de diferente proporción HA/PEA, producir los sistemas combinados HA-bl-PEA con diferente arquitectura: *films* bidimensionales (vía *solvent casting*), membranas hiladas (vía *electrospinning*), *scaffolds* tridimensionales (vía *freeze-extraction*).

HA y PEA muestran la continuidad de sus fases en los sistemas desarrollados, combinan sus propiedades según la proporción entre ellos y en función del tipo del sistema, y además experimentan influencia mutua, hasta mostrar cierto efecto reforzante de una fase sobre otra. Sus respectivos sistemas combinados son aptos para las aplicaciones en ingeniería tisular que necesitan de un biomaterial semidegradable.

Aplicando el propuesto pre-tratamiento del EA, se consigue su buena copolimerización con el carboxiacrilato de etilo (CEA) que proporciona a los respectivos sistemas copoliméricos algunas propiedades singulares que carecía el PEA: la hidrofiliidad, funcionalizabilidad, formación de puentes de hidrógeno, posibilidad de entrecruzamiento covalente o no covalente con HA, entre otras.

Los sistemas copoliméricos, P(EA-co-CEA), tanto entrecruzados como no entrecruzados, poseen adecuadas propiedades físico-químicas y son biocompatibles, por lo que pueden ser empleados *per se* para la producción de andamiajes a su base con el destino para ingeniería tisular de tejidos blandos.

En particular, el sistema P(EA-co-CEA) no entrecruzado, de relación molar EA/CEA=90/10, muestra un potencial mayor que PEA para la producción de sistemas combinados con HA, también aprovechando el FA como disolvente común. Las pruebas preliminares realizadas con sus respectivos *blends*, HA-bl-P(EA-co-CEA), exhiben el alto grado de interacción con el HA, lo que permite esperar la obtención de biomateriales estables a base de sus combinaciones.

7.2. TRABAJO FUTURO Y PERSPECTIVAS

El ácido fórmico ha mostrado algunas propiedades que pueden considerarse “desventajosas” para la producción de sistemas combinados. Su baja volatilidad ralentiza el proceso de *solvent casting* y aumenta la posibilidad de separación de fases entre los polímeros disueltos. Su tendencia a formar puentes de hidrógeno con los polímeros incrementa su retención en la matriz polimérica y dificulta su extracción posterior. Sus propios grupos carboxilo participan en la formación de enlaces éster y compiten con los carboxilos de HA y CEA en los entrecruzamientos mediante DEO.

Para incrementar el potencial del uso de los sistemas combinados HA-PEA y explotar mejor las propiedades del ácido hialurónico habrá que resolver el problema de la estabilidad de la fase HA en medio acuoso. Para esto, será esencial conseguir su entrecruzamiento, ya sea *in situ*, durante la producción de sistemas combinados, o después (tratamiento post-producción), cuando los sistemas ya no contendrán el ácido fórmico capaz de intervenir en el proceso de reticulación.

En cuanto a los sistemas copoliméricos P(EA-co-CEA), como un producto novedoso, será necesario llevar a cabo el estudio de su degradación a largo plazo en condiciones similares a fisiológicas, determinando su biodegradabilidad en función de la composición y entrecruzamiento, y comprobando el carácter no citotóxico de los productos de su degradación.

Será de alta importancia resolver los problemas de la escasa solubilidad de PCEA y sus copolímeros no entrecruzados. Una posible opción sería buscar un co-disolvente que, siendo compatible con el ácido fórmico, actuaría en contra de los puentes de hidrógeno que reducen la solubilidad de estos sistemas. En este caso, sería posible utilizar PCEA y sus copolímeros para fabricación de membranas hiladas vía *electrospinning*, o los *scaffolds* tridimensionales vía freeze-extraction, tanto en combinación con el HA, como solos.

Por último, los sistemas copoliméricos P(EA-co-CEA) entrecruzados, igual que homopolímero PCEA entrecruzado, presentan mayor potencial que el PEA entrecruzado, para la producción de las *semi-IPNs* con el ácido

hialurónico, ya que: (a) muestran buen grado de hinchamiento no solo en el ácido fórmico, sino que también en agua y medios acuosos (como PBS), y (b) debido a la formación de puentes de hidrógeno con HA, podrían asegurar mayor grado de retención de HA en su matriz.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chaignaud BE, Langer R, Vacanti JP. The History of Tissue Engineering Using Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds and Cells. In: Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds. 1997.
2. Langer R, Vacanti J. Advances in tissue engineering. In: Journal of Pediatric Surgery. 2016.
3. Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E. Biomaterials science: An introduction to materials in medicine. Biomaterials Science: an Introduction To Materials in Medicine. 1996.
4. John P . Fisher AG. M and JD. B. Tissue Engineering. In: Tissue Engineering. 2007. p. 18–143, 242–59, 304–25.
5. Hutmacher D. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues—state of the art and future perspectives. J Biomater Sci Polym Ed. 2001;
6. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. Prog Polym Sci. 2007 Aug;32(8–9):762–98.
7. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. Macromol Biosci. 2004 Aug 9;4(8):743–65.
8. Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CXF, Tan KC, Lim TC. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. J Tissue Eng Regen Med. 2007;
9. Krevelen DW van, Nijenhuis K te. Properties of Polymers. 2009. 1004 p.
10. Krevelen DW van. Properties of Polymers. Properties of Polymers. 2012.
11. Olmedilla MP, Lebourg M, Ivirico JE, Nebot I, Giralt NG, Ferrer GG, et al. In vitro 3D culture of human chondrocytes using modified ϵ -caprolactone scaffolds with varying hydrophilicity and porosity. J Biomater Appl. 2012;27(3):299–309.
12. Diego RB, Esteílés JM, Sanz JA, García-Asnar JM, Sánchez MS. Polymer scaffolds with interconnected spherical pores and controlled architecture for tissue engineering: Fabrication, mechanical properties, and finite element modeling. J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater. 2007;
13. Arnal-Pastor M, Martínez-Ramos C, Vallés-Lluch A, Pradas MM. Influence of scaffold morphology on co-cultures of human endothelial and adipose tissue-derived stem cells. J Biomed Mater Res - Part A. 2016;
14. Wei YT, Tian WM, Yu X, Cui FZ, Hou SP, Xu QY, et al. Hyaluronic acid hydrogels with IKVAV peptides for tissue repair and axonal regeneration in an injured rat brain. Biomed Mater. 2007;

15. Nisbet DR, Rodda AE, Horne MK, Forsythe JS, Finkelstein DI. Neurite infiltration and cellular response to electrospun polycaprolactone scaffolds implanted into the brain. *Biomaterials*. 2009;
16. Wong DY, Krebsbach PH, Hollister SJ. Brain cortex regeneration affected by scaffold architectures. *J Neurosurg*. 2008;
17. Elisseeff J, Ferran A, Hwang S, Varghese S, Zhang Z. The role of biomaterials in stem cell differentiation: Applications in the musculoskeletal system. *Stem Cells Dev*. 2006;
18. Tate CC, Shear DA, Tate MC, Archer DR, Stein DG, LaPlaca MC. Laminin and fibronectin scaffolds enhance neural stem cell transplantation into the injured brain. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009;
19. Harrison K. Introduction to polymeric scaffolds for tissue engineering. *Biomed Polym*. 2007;
20. Ivashchenko S, Escobar Ivirico JL, García Cruz DM, Campillo-Fernández A, Ferrer GG, Pradas MM. Bioactive organic-inorganic poly(CLMA-co-HEA)/silica nanocomposites. *J Biomater Appl*. 2015;29(8).
21. Genové Corominas E. Self-assembling peptide scaffolds as extracellular matrix analogs and their application in tissue engineering and regenerative biology. *Chem* 2007;2.
22. King VR, Alovskaya A, Wei DYT, Brown RA, Priestley J V. The use of injectable forms of fibrin and fibronectin to support axonal ingrowth after spinal cord injury. *Biomaterials*. 2010;
23. Khaing ZZ, Milman BD, Vanscoy JE, Seidlits SK, Grill RJ, Schmidt CE. High molecular weight hyaluronic acid limits astrocyte activation and scar formation after spinal cord injury. *J Neural Eng*. 2011;
24. Stokols S, Tuszynski MH. Freeze-dried agarose scaffolds with uniaxial channels stimulate and guide linear axonal growth following spinal cord injury. *Biomaterials*. 2006;
25. Chvatal SA, Kim YT, Bratt-Leal AM, Lee H, Bellamkonda R V. Spatial distribution and acute anti-inflammatory effects of Methylprednisolone after sustained local delivery to the contused spinal cord. *Biomaterials*. 2008;
26. Fornaro M, Plescia J, Chheang S, Tallini G, Zhu YM, King M, et al. Fibronectin Protects Prostate Cancer Cells from Tumor Necrosis Factor-alpha-induced Apoptosis via the AKT/Survivin Pathway. *J Biol Chem*. 2003;
27. Taylor L. Neurotrophin-3 Gradients Established by Lentiviral Gene Delivery Promote Short-Distance Axonal Bridging beyond Cellular Grafts in the Injured Spinal Cord. *J Neurosci*. 2006;

28. Wang Y, Cooke MJ, Morshead CM, Shoichet MS. Hydrogel delivery of erythropoietin to the brain for endogenous stem cell stimulation after stroke injury. *Biomaterials*. 2012;
29. Qu C, Xiong Y, Mahmood A, Kaplan DL, Goussev A, Ning R, et al. Treatment of traumatic brain injury in mice with bone marrow stromal cell-impregnated collagen scaffolds. *J Neurosurg*. 2009;
30. Tate MC, Shear DA, Hoffman SW, Stein DG, LaPlaca MC. Biocompatibility of methylcellulose-based constructs designed for intracerebral gelation following experimental traumatic brain injury. *Biomaterials*. 2001;
31. Lu D, Mahmood A, Qu C, Hong X, Kaplan D, Chopp M. Collagen scaffolds populated with human marrow stromal cells reduce lesion volume and improve functional outcome after traumatic brain injury. *Neurosurgery*. 2007;
32. Mingyu C, Kai G, Jiamou L, Yandao G, Nanming Z, Xiufang Z. Surface Modification and Characterization of Chitosan Film Blended with Poly-L-Lysine. *J Biomater Appl*. 2004;
33. Patist CM, Mulder MB, Gautier SE, Maquet V, Jérôme R, Oudega M. Freeze-dried poly(D,L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds impregnated with brain-derived neurotrophic factor in the transected adult rat thoracic spinal cord. *Biomaterials*. 2004;
34. Hurtado A, Moon LDF, Maquet V, Blits B, Jérôme R, Oudega M. Poly (D,L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds seeded with Schwann cells genetically modified to secrete a bi-functional neurotrophin implanted in the completely transected adult rat thoracic spinal cord. *Biomaterials*. 2006;
35. Hurtado A, Cregg JM, Wang HB, Wendell DF, Oudega M, Gilbert RJ, et al. Robust CNS regeneration after complete spinal cord transection using aligned poly-l-lactic acid microfibers. *Biomaterials*. 2011;
36. Yang Y, De Laporte L, Zelivyanskaya ML, Whittlesey KJ, Anderson AJ, Cummings BJ, et al. Multiple channel bridges for spinal cord injury: cellular characterization of host response. *Tissue Eng Part A*. 2009;
37. Lowry N, Goderie SK, Lederman P, Charniga C, Gooch MR, Gracey KD, et al. The effect of long-term release of Shh from implanted biodegradable microspheres on recovery from spinal cord injury in mice. *Biomaterials*. 2012;
38. Moore MJ, Friedman JA, Lewellyn EB, Mantila SM, Krych AJ, Ameenuddin S, et al. Multiple-channel scaffolds to promote spinal cord axon regeneration. *Biomaterials*. 2006;
39. Tuinstra HM, Aviles MO, Shin S, Holland SJ, Zelivyanskaya ML, Fast AG, et al. Multifunctional, multichannel bridges that deliver neurotrophin encoding

- lentivirus for regeneration following spinal cord injury. *Biomaterials*. 2012;
40. Olson HE, Rooney GE, Gross L, Nesbitt JJ, Galvin KE, Knight A, et al. Neural stem cell- and Schwann cell-loaded biodegradable polymer scaffolds support axonal regeneration in the transected spinal cord. *Tissue Eng Part A*. 2009;
 41. Chen BK, Knight AM, Madigan NN, Gross L, Dadsetan M, Nesbitt JJ, et al. Comparison of polymer scaffolds in rat spinal cord: A step toward quantitative assessment of combinatorial approaches to spinal cord repair. *Biomaterials*. 2011;
 42. Gelain F, Panseri S, Antonini S, Cunha C, Donega M, Lowery J, et al. Transplantation of nanostructured composite scaffolds results in the regeneration of chronically injured spinal cords. *ACS Nano*. 2011;
 43. Lewitus DY, Smith KL, Shain W, Bolikal D, Kohn J. The fate of ultrafast degrading polymeric implants in the brain. *Biomaterials*. 2011;
 44. Azemi E, Lagenaur CF, Cui XT. The surface immobilization of the neural adhesion molecule L1 on neural probes and its effect on neuronal density and gliosis at the probe/tissue interface. *Biomaterials*. 2011;
 45. Moon SU, Bokara KK, Khang D, Webster TJ, Lee JE. Carbon nanotubes impregnated with subventricular zone neural progenitor cells promotes recovery from stroke. 2012;2751–65.
 46. Wong DY, Hollister SJ, Krebsbach PH, Nosrat C. Poly(ϵ -Caprolactone) and Poly(L-Lactic-Co-Glycolic Acid) Degradable Polymer Sponges Attenuate Astrocyte Response and Lesion Growth in Acute Traumatic Brain Injury. *Tissue Eng*. 2007;
 47. Martinelli M, Froimowicz P. *Materiales Poliméricos Funcionalizados. ... Polímeros*. 2003;
 48. Ohara T, Sato T, Shimizu N, Prescher G, Schwind H, Weiberg O, et al. Acrylic Acid and Derivatives. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2000.
 49. Lewis G. Alternative acrylic bone cement formulations for cemented arthroplasties: Present status, key issues, and future prospects. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. 2008.
 50. Vallés-Lluch A, Novella-Maestre E, Sancho-Tello M, Pradas MM, Ferrer GG, Batalla CC. Mimicking Natural Dentin Using Bioactive Nanohybrid Scaffolds for Dentinal Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A*. 2010;
 51. Odian G. *Principle of Polymerization*. Princ Polym Wiley sons. 2004;
 52. Pérez Olmedilla M, Garcia-Giralt N, Pradas MM, Ruiz PB, Gómez Ribelles JL, Palou EC, et al. Response of human chondrocytes to a non-uniform distribution of hydrophilic domains on poly (ethyl acrylate-co-hydroxyethyl methacrylate)

- copolymers. *Biomaterials*. 2006;27(7):1003–12.
53. Campillo-Fernandez AJ, Pastor S, Abad-Collado M, Bataille L, Gomez-Ribelles JL, Meseguer-Deñas JM, et al. Future design of a new keratoprosthesis. Physical and biological analysis of polymeric substrates for epithelial cell growth. *Biomacromolecules*. 2007;
 54. Campillo-Fernández AJ, Unger RE, Peters K, Halstenberg S, Santos M, Sánchez MS, et al. Analysis of the Biological Response of Endothelial and Fibroblast Cells Cultured on Synthetic Scaffolds with Various Hydrophilic/Hydrophobic Ratios: Influence of Fibronectin Adsorption and Conformation. *Tissue Eng Part A*. 2009;
 55. Soria JM, Martínez Ramos C, Salmerón Sánchez M, Benavent V, Campillo Fernández A, Gómez Ribelles JL, et al. Survival and differentiation of embryonic neural explants on different biomaterials. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2006;
 56. Soria JM, Martínez Ramos C, Bahamonde O, García Cruz DM, Salmerón Sánchez M, García Esparza MA, et al. Influence of the substrate's hydrophilicity on the in vitro Schwann cells viability. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2007;
 57. Martínez-Ramos C, Lainez S, Sancho F, García Esparza MA, Planells-Cases R, García Verdugo JM, et al. Differentiation of postnatal neural stem cells into glia and functional neurons on laminin-coated polymeric substrates. *Tissue Eng Part A*. 2008;
 58. Soria JM, Sancho-Tello M, Esparza MAG, Mirabet V, Bagan JV, Monleón M, et al. Biomaterials coated by dental pulp cells as substrate for neural stem cell differentiation. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2011;
 59. Martínez-Ramos C, Vallés-Lluch A, Verdugo JMG, Ribelles JLG, Barcia JA, Orts AB, et al. Channeled scaffolds implanted in adult rat brain. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2012;
 60. Martínez-Ramos C, Gómez-Pinedo U, Esparza MAG, Soria JM, Barcia JA, Monleón Pradas M. Neural tissue regeneration in experimental brain injury model with channeled scaffolds of acrylate copolymers. *Neurosci Lett*. 2015;
 61. Conejero-García A, Vilariño-Feltre G, Martínez-Ramos C, Monleón Pradas M, Vallés-Lluch A. Channeled polymeric scaffolds with polypeptide gel filling for lengthwise guidance of neural cells. *Eur Polym J*. 2015;
 62. Rocamonde B, Paradells S, Garcia Esparza MA, Vives MS, Sauro S, Ramos CM, et al. Combined application of polyacrylate scaffold and lipoic acid treatment promotes neural tissue reparation after brain injury. *Brain Inj*. 2016;
 63. Rico P, Hernández JCR, Moratal D, Altankov G, Pradas MM, Salmerón-Sánchez M. Substrate-Induced Assembly of Fibronectin into Networks: Influence of

- Surface Chemistry and Effect on Osteoblast Adhesion. *Tissue Eng Part A*. 2009;
64. Vallés-Lluch A, Arnal-Pastor M, Martínez-Ramos C, Vilariño-Feltrer G, Vikingsson L, Castells-Sala C, et al. Combining self-assembling peptide gels with three-dimensional elastomer scaffolds. *Acta Biomater*. 2013;
 65. Chachques JC, Pradas MM, Bayes-Genis A, Semino C. Creating the bioartificial myocardium for cardiac repair: challenges and clinical targets. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2013;
 66. Martínez-Ramos C, Rodríguez-Pérez E, Garnes MP, Chachques JC, Moratal D, Vallés-Lluch A, et al. Design and Assembly Procedures for Large-Sized Biohybrid Scaffolds as Patches for Myocardial Infarct. *Tissue Eng Part C Methods*. 2014;
 67. Mei Y, Saha K, Bogatyrev SR, Yang J, Hook AL, Kalcioğlu ZI, et al. Combinatorial development of biomaterials for clonal growth of human pluripotent stem cells. *Nat Mater*. 2010;
 68. Vallés Lluch A, Campillo Fernández A, Gallego Ferrer G, Monleón Pradas M. Bioactive scaffolds mimicking natural dentin structure. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2009;
 69. Rodríguez Hernández JC, Salmerón Sánchez M, Soria JM, Gómez Ribelles JL, Monleón Pradas M. Substrate chemistry-dependent conformations of single laminin molecules on polymer surfaces are revealed by the phase signal of atomic force microscopy. *Biophys J*. 2007;
 70. Toromanov G, González-García C, Altankov G, Salmerón-Sánchez M. Vitronectin activity on polymer substrates with controlled -OH density. *Polymer (Guildf)*. 2010;
 71. Diego RB, Olmedilla MP, Aroca ÁS, Ribelles JLG, Pradas MM, Ferrer GG, et al. Acrylic scaffolds with interconnected spherical pores and controlled hydrophilicity for tissue engineering. *J Mater Sci*. 2005;
 72. Rodríguez Hernández JC, Serrano Aroca Á, Gómez Ribelles JL, Monleón Pradas M. Three-dimensional nanocomposite scaffolds with ordered cylindrical orthogonal pores. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2008;
 73. Arnal-Pastor M, Vallés-Lluch a, Keicher M, Pradas MM. Coating typologies and constrained swelling of hyaluronic acid gels within scaffold pores. *J Colloid Interface Sci*. 2011 Sep 1;361(1):361–9.
 74. Vallés-Lluch A, Arnal-Pastor M, Martínez-Ramos C, Vilariño-Feltrer G, Vikingsson L, Monleón Pradas M. Grid polymeric scaffolds with polypeptide gel filling as patches for infarcted tissue regeneration. *Conf Proc . Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc IEEE Eng Med Biol Soc Annu Conf*. 2013;

75. Más Estellés J, Krakovsky I, Rodríguez Hernández JC, Piotrowska AM, Monleón Pradas M. Mechanical properties of porous crosslinked poly(ethyl-acrylate) for tissue engineering. *J Mater Sci.* 2007;42(20):8629–35.
76. Arnal-Pastor M, Vallés-Lluch A, Keicher M, Pradas MM. Coating typologies and constrained swelling of hyaluronic acid gels within scaffold pores. *J Colloid Interface Sci.* 2011;
77. Sigma-Aldrich Co. 2-Carboxyethyl acrylate oligomers [Internet]. [cited 2015 Aug 4]. Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/407585>
78. Polysciences I. Beta-Carboxyethyl Acrylate, Distribution [Internet]. Catalog Products. [cited 2015 Jul 15]. Available from: <http://www.polysciences.com/default/beta-carboxyethyl-acrylate-98-active>
79. Kim MS, Choi YJ, Noh I, Tae G. Synthesis and characterization of in situ chitosan-based hydrogel via grafting of carboxyethyl acrylate. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2007;
80. Andrei G. Fadeev, Jennifer Gehman, Arthur Winston Martin ZM, Christopher B. Shogbon, David Michael Weber YZ. Patente en EEUU 8.329.469 B2, 2011. 2011.
81. Jennifer Gehman, Arthur W. Martin, Zara Melkounian CBS, David M. Weber YZ. Patente en EEUU 8.168.433 B2, 2012. 2012.
82. James P. Beltzer, Michelle Dawn Fabian, Edward John Fewkes KR, McCarthy FV. Patente en EEUU 2011/0027888 A1, 2011. 2011.
83. David Henry, Martial Hervy, Marylene Denise CW. Patente en EEUU 2012/0282697 A1, 2012. 2012.
84. Timothy J. Merkel, Kai Chen JMD. Synthesis and Characterization of Novel Low Modulus Hydrogels for Use in the Fabrication of PRINT Particle. *Polym Prepr.* 2011;52(2):pp 216.
85. Melkounian Z, Weber JL, Weber DM, Fadeev AG, Zhou Y, Dolley-Sonneville P, et al. Synthetic peptide-acrylate surfaces for long-term self-renewal and cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2010;28(6):606–10.
86. Merkel TJ, Jones SW, Herlihy KP, Kersey FR, Shields AR, Napier M, et al. Using mechanobiological mimicry of red blood cells to extend circulation times of hydrogel microparticles. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(2):586–91.
87. Robin E. Wright, Mahfuza B. Ali, Jessica M. Buchholz, Louis C. Haddad L, Kolson, Matthew T. Scholz, Narilla Y. StePanova, Michael J. Svarovsky RL, Walter CMY. Patente en EEUU 7.939.578 B2, 2011. 2011.

88. Robin E. Wright, Mahfuza B. Ali, Jessica M. Buchholz, Louis C. Haddad L, Kolson, Matthew T. Scholz, Narilla Y. StePanova, Michael J. Svarovsky RL, Walter CMY. Patente en EEUU 8.513.322 B2, 2013. 2013.
89. Laurent TC, Laurent UB, Fraser JR. Functions of hyaluronan. *Ann Rheum Dis.* 1995;54(5):429.
90. Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med.* 1997;
91. Collins MN, Birkinshaw C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering-A review. *Carbohydr Polym.* 2013 Feb 15;92(2):1262–79.
92. Dicker KT, Gurski LA, Pradhan-Bhatt S, Witt RL, Farach-Carson MC, Jia X. Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomater.* 2014;10(4):1558–70.
93. Abatangelo G, Martelli M, Vecchia P. Healing of hyaluronic acid-enriched wounds: Histological observations. *J Surg Res.* 1983;
94. Morra M. Engineering of biomaterials surfaces by hyaluronan. *Biomacromolecules.* 2005.
95. Vashist A, Vashist A, Gupta YK, Ahmad S. Recent advances in hydrogel based drug delivery systems for the human body. *J Mater Chem B.* 2014;
96. Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *FASEB J.* 1992;
97. Fujii T, Sun YL, An KN, Luo ZP. Mechanical properties of single hyaluronan molecules. *J Biomech.* 2002;
98. Guss JM, Hukins DWL, Smith PJC, Winter WT, Arnott S, Moorhouse R, et al. Hyaluronic acid: Molecular conformations and interactions in two sodium salts. *J Mol Biol.* 1975;
99. Arnott S, Mitra AK, Raghunathan S. Hyaluronic acid double helix. *J Mol Biol.* 1983;
100. Scott JE, Cummings C, Brass A, Chen Y. Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous-Solution, Investigated by Rotary Shadowing Electron-Microscopy and Computer-Simulation - Hyaluronan Is A Very Efficient Network-Forming Polymer. *Biochem J.* 1991;
101. Mensitieri M, Ambrosio L, Nicolais L, Bellini D, O'Regan M. Viscoelastic properties modulation of a novel autocrosslinked hyaluronic acid polymer. *J Mater Sci Mater Med.* 1996;
102. Segura T, Anderson BC, Chung PH, Webber RE, Shull KR, Shea LD. Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: A strategy to functionalize and pattern. *Biomaterials.* 2005;

103. Collins MN, Birkinshaw C. Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(11):3335–43.
104. Collins MN, Birkinshaw C. Comparison of the Effectiveness of Four Different Crosslinking Agents with Hyaluronic Acid Hydrogel Films for Tissue-Culture Applications. 2007;
105. Zhao XB, Fraser JE, Alexander C, Lockett C, White BJ. Synthesis and characterization of a novel double crosslinked hyaluronan hydrogel. *J Mater Sci Mater Med*. 2002 Jan;13(1):11–6.
106. Zhao X. Synthesis and characterization of a novel hyaluronic acid hydrogel. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2006 Jan;17(4):419–33.
107. Leach JB, Schmidt CE. Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. 2005;
108. Bencherif SA, Srinivasan A, Horkay F, Hollinger JO, Matyjaszewski K, Washburn NR. Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties. *Biomaterials*. 2008;
109. Eschbach FO, Huang SJ. Hydrophilic-hydrophobic interpenetrating polymer networks and semi-interpenetrating polymer networks. In: *interpenetrating polymer networks*. 1994.
110. Thapliyal PC. *Interpenetrating Polymer Networks*. Compos Interfaces. 2010;
111. Rogovina LZ, Dembo AT, Sharma PRS, Frisch HL, Schulz M. Swollen interpenetrating polymer networks. *Polymer (Guildf)*. 2000;
112. Lozano Picazo P, Pérez Garnes M, Martínez Ramos C, Vallés-Lluch A, Monleón Pradas M. New semi-biodegradable materials from semi-interpenetrated networks of poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethyl acrylate). *Macromol Biosci*. 2015;
113. Perez Garnes M. Structures based on semi-degradable biomaterials for neural regeneration in the central nervous system. 2015.
114. Rodríguez-Pérez E, Lloret Compañ A, Monleón Pradas M, Martínez-Ramos C. Scaffolds of Hyaluronic Acid-Poly(Ethyl Acrylate) Interpenetrating Networks: Characterization and In Vitro Studies. *Macromol Biosci*. 2016;
115. Promega Corporation. Solution Cell Proliferation CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. www.PromegaCom/Protocols/. 2012;2014-12–5.
116. Barltrop JA, Owen TC, Cory AH, Cory JG. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfofenyl)te trazolium, inner salt (MTS) and related

- analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans As cell-viability indicators. *Bioorganic Med Chem Lett.* 1991;
117. Reutemann W, Kieczka H. Formic Acid. *Ullmann's Encycl Ind Chem.* 2000;
 118. Zeitsch KJ. Properties of formic acid. In: *The chemistry and technology of furfural and its many by-products.* 2000.
 119. Reutemann W, Kieczka H. Formic acid. *Ullmann's Encycl Ind Chem.* 2012;
 120. L. A. Utracki CHV. *Polymer alloys and blends: Thermodynamics and rheology.* *Polym Int.* 1991;
 121. Olmedilla MP, Lebourg M, Ivirico JLE, Nebot I, Giralt NG, Ferrer GG, et al. In vitro 3D culture of human chondrocytes using modified ϵ -caprolactone scaffolds with varying hydrophilicity and porosity. *J Biomater Appl.* 2011;
 122. Escobar Ivirico JL, Salmerón Sánchez M, Sabater i Serra R, Meseguer Dueñas JM, Gómez Ribelles JL, Monleón Pradas M. Structure and Properties of Poly(ϵ -caprolactone) Networks with Modulated Water Uptake. *Macromol Chem Phys.* 2006 Dec 1;207(23):2195–205.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| <i>Figura 1. Estructura química del PEA.</i> | <i>21</i> |
| <i>Figura 2. Estructura química del PCEA.</i> | <i>23</i> |
| <i>Figura 3. Estructura química del Ácido Hialurónico.</i> | <i>25</i> |
| <i>Figura 4. El aspecto hinchado de los sistemas P(EA-co-CEA) no entrecruzados durante su lavado.....</i> | <i>42</i> |
| <i>Figura 5. Pruebas de hinchamiento en inmersión.</i> | <i>51</i> |
| <i>Figura 6. Medición del ángulo de contacto (θ).....</i> | <i>52</i> |
| <i>Figura 7. Reacción química fundamental para el ensayo de MTS.....</i> | <i>54</i> |
| <i>Figura 8. Fórmula estructural del ácido fórmico.</i> | <i>60</i> |
| <i>Figura 9. Espectros de FTIR de HA_FA (arriba) y PEA_FA (abajo).....</i> | <i>64</i> |
| <i>Figura 10. Arriba: volumen específico de films de HA obtenidos vía solvent casting de ácido fórmico, sosa y agua. Abajo: volumen específico de films de PEA entrecruzado (_X), tras incubación de 1 y 3 días en ácido fórmico y acetona, así como de los films de PEA no entrecruzado (_noX) obtenidos vía solvent casting de ácido fórmico y acetona. El número incluido en el nombre de cada muestra de PEA indica la duración (en días) de la incubación o la “vejez” de la disolución sometida a solvent casting.</i> | <i>65</i> |
| <i>Figura 11. Termogramas de TGA de las muestras de PEA y HA: peso residual (arriba) y derivada de pérdida de peso (abajo), respecto a la temperatura.</i> | <i>66</i> |
| <i>Figura 12. Termogramas de DSC (arriba) y DMTA (abajo) de las muestras de HA y PEA.....</i> | <i>67</i> |
| <i>Figura 13. Resultados del ensayo de citotoxicidad con los extractos de PEA y HA obtenidos tras 1, 3 y 7 días de extracción.</i> | <i>70</i> |
| <i>Figura 14. Fotos de los films HA-PEA, producidos vía solvent casting.....</i> | <i>76</i> |
| <i>Figura 15. Espectros de FTIR de los films HA-PEA, producidos vía solvent casting.</i> | <i>76</i> |
| <i>Figura 16. Imágenes de AFM de las superficies de los films HA-PEA, basados en el módulo de almacenamiento, E' (izquierda) o en su logaritmo, $\log(E')$, (derecha).</i> | <i>77</i> |
| <i>Figura 17. Termogramas de TGA de los films HA-PEA producidos vía solvent casting. Insertos: su composición actual frente a nominal.....</i> | <i>78</i> |
| <i>Figura 18. Arriba: Termogramas de DSC de los films HA-PEA producidos vía solvent casting. Abajo: algunos parámetros de la transición vítrea en función del contenido de PEA.....</i> | <i>80</i> |
| <i>Figura 19. Termogramas del módulo de almacenamiento, E' (arriba) y del tangente del ángulo de pérdidas, $\tan \delta$ (abajo) obtenidos en DMTA de los films HA-PEA.</i> | <i>81</i> |
| <i>Figura 20. Fotos de microscopía óptica mostrando las alteraciones morfológicas del film 50HA/50PEA tras su degradación en agua (_W) o en acetona (_A).....</i> | <i>84</i> |

| | |
|--|------------|
| <i>Figura 21. Termogramas de TGA (arriba) y de DSC (abajo) revelando los cambios en la composición y otras propiedades de los films 50/50 tras su degradación en agua (_W) y en acetona (_A).....</i> | <i>84</i> |
| <i>Figura 22. Viabilidad celular determinada en el ensayo de citotoxicidad con los extractos de los films HA-PEA, obtenidos vía solvent casting.....</i> | <i>85</i> |
| <i>Figura 23. Imágenes SEM de membranas HA-PEA producidas vía co-electrospinning.....</i> | <i>88</i> |
| <i>Figura 24. Imágenes de SEM de las membranas HA-PEA 50/50 producidas vía electrospinning convencional: sin nanotubos de carbono (arriba) y con nanotubos de carbono (abajo).</i> | <i>88</i> |
| <i>Figura 25. Espectros de FTIR de las membranas HA-PEA 50/50 y 30/70 producidas vía electrospinning convencional.....</i> | <i>89</i> |
| <i>Figura 26. Termogramas de TGA de las membranas HA-PEA producidos vía electrospinning, así como de las membranas 50/50 tras su incubación en Agua (_W) o acetona (_A). Insertos: su composición actual frente a nominal.....</i> | <i>90</i> |
| <i>Figura 27. Imágenes de microscopía óptica de las membranas hiladas HA-PEA 50/50 sin nanotubos de carbono: en su estado seco original (arriba), tras su incubación en acetona (medio) y agua (abajo).</i> | <i>92</i> |
| <i>Figura 28. Imágenes de microscopía óptica de las membranas hiladas HA-PEA 50/50 con nanotubos de carbono: en su estado seco original (arriba), tras su incubación en acetona (medio) y agua (abajo).</i> | <i>93</i> |
| <i>Figura 29. Imágenes de SEM de los scaffolds producidos vía freeze-extraction de HA_FA, PEA_FA y su mezcla 50/50.....</i> | <i>95</i> |
| <i>Figura 30. Estructura variable de CEA.</i> | <i>103</i> |
| <i>Figura 31. El aspecto definitivo del copolímero 90/10 no entrecruzado, después del lavado (izquierda) y de secado (derecha).</i> | <i>105</i> |
| <i>Figura 32. Espectros de FTIR para los sistemas no entrecruzados (arriba) y entrecruzados (abajo).</i> | <i>108</i> |
| <i>Figura 33. Termogramas de masa residual (arriba) y derivada de su pérdida (abajo), en función de temperatura, para sistemas no entrecruzados.</i> | <i>110</i> |
| <i>Figura 34. Termogramas de masa residual (arriba) y derivada de su pérdida (abajo), en función de temperatura, para los sistemas entrecruzados.</i> | <i>111</i> |
| <i>Figura 35. Volumen específico de los sistemas entrecruzados y no entrecruzados, respecto al contenido actual de CEA.....</i> | <i>113</i> |
| <i>Figura 36. Arriba: termogramas de DSC para los sistemas no entrecruzados. Abajo: Onset, ΔT_g, T_g y Δc_p, en función del contenido de CEA en los materiales.</i> | <i>116</i> |
| <i>Figura 37. Arriba: termogramas de DSC para los sistemas entrecruzados. Abajo: Onset, ΔT_g, T_g y Δc_p, en función del contenido de CEA en los materiales.</i> | <i>117</i> |
| <i>Figura 38. Progreso de desvitrificación con temperatura en los sistemas entrecruzados (derecha) y no entrecruzados (izquierda).</i> | <i>118</i> |
| <i>Figura 39. El efecto de entrecruzamiento en los homopolímeros, revelado por los ensayos de TGA (izquierda) y DSC (derecha).</i> | <i>118</i> |

| | |
|--|------------|
| <i>Figura 40. Caída del módulo de almacenamiento (E'/E'inicial, en %) y el tangente de pérdidas ($\tan \delta$), respecto a temperatura, en los sistemas no entrecruzados. Inserto: temperatura de relajación principal (T_{α}) en función del contenido actual de CEA.</i> | <i>120</i> |
| <i>Figura 41. Caída del módulo de almacenamiento (E'/E'inicial, en %) y el tangente de pérdidas ($\tan \delta$), respecto a temperatura, en los sistemas entrecruzados. Inserto: temperatura de relajación principal (T_{α}) en función del contenido actual de CEA.</i> | <i>121</i> |
| <i>Figura 42. Efectos de algunos medios sobre la composición y propiedades térmicas de PCEA_noX.</i> | <i>123</i> |
| <i>Figura 43. Hinchamiento en agua de los sistemas entrecruzados (abajo) y no entrecruzados (arriba). Insertos: hinchamiento de homopolímero de PCEA.</i> | <i>128</i> |
| <i>Figura 44. Hinchamiento de los sistemas entrecruzados en Acetona, Dioxano y Ácido Fórmico.</i> | <i>129</i> |
| <i>Figura 45. Hinchamiento de los sistemas entrecruzados (abajo) y no entrecruzados (arriba) en Agua miliQ, medido respecto a la masa seca inicial.</i> | <i>130</i> |
| <i>Figura 46. Hinchamiento de los sistemas entrecruzados (abajo) y no entrecruzados (arriba) en Agua miliQ, medido respecto al diámetro seco inicial.</i> | <i>131</i> |
| <i>Figura 47. Hinchamiento de los sistemas entrecruzados (abajo) y no entrecruzados (arriba) en PBS, medido respecto a la masa seca inicial.</i> | <i>132</i> |
| <i>Figura 48. Hinchamiento de los sistemas entrecruzados (abajo) y no entrecruzados (arriba) en PBS, medido respecto al diámetro seco inicial.</i> | <i>133</i> |
| <i>Figura 49. Fotos de muestras hinchadas al terminar el ensayo: en Agua miliQ (arriba) y en PBS (abajo).</i> | <i>134</i> |
| <i>Figura 50. Valores máximos de hinchamiento, medidos respecto tanto a la masa, como al diámetro, de los sistemas entrecruzados y no entrecruzados alcanzadas en agua miliQ y PBS.</i> | <i>135</i> |
| <i>Figura 51. Arriba: Peso seco residual tras realizar el ensayo de 21 días de hinchamiento de los sistemas entrecruzados y no entrecruzados en agua milliQ y PBS. Abajo: pH residual de agua milliQ y PBS en los pocillos tras terminar el ensayo.</i> | <i>135</i> |
| <i>Figura 52. Ángulo de contacto con Agua y Dietilenglicol, medido en los sistemas entrecruzados y no entrecruzados.</i> | <i>136</i> |
| <i>Figura 53. Aspecto general de cambio de pH durante el acondicionamiento de los discos de sistemas entrecruzados en el medio de cultivo.</i> | <i>138</i> |
| <i>Figura 54. Densidad óptica, medida en el ensayo de MTS para los cultivos de fibroblastos de 1, 3 y 7 días, en los sistemas entrecruzados (abajo) y no entrecruzados (arriba).</i> | <i>138</i> |
| <i>Figura 55. Imágenes de microscopía óptica ilustrando morfología de los fibroblastos tras el cultivo de 1, 3 y 7 días, en los sistemas entrecruzados.</i> | <i>139</i> |

| | |
|--|------------|
| <i>Figura 56. Espectros de FTIR de los films HA-Copolímero, producidos vía solvent casting.....</i> | <i>148</i> |
| <i>Figura 57. Termogramas de TGA y composición actual frente a nominal de los films HA-Copolímero.....</i> | <i>149</i> |
| <i>Figura 58. Termogramas de DSC (arriba) y algunos parámetros de la transición vítrea (abajo) de los films HA-Copolímero.....</i> | <i>150</i> |
| <i>Figura 59. Termogramas del módulo de almacenamiento, E', (arriba) y del tangente del ángulo de pérdidas, $\tan \delta$ (abajo) obtenidos en DMTA de los films HA-Copolímero. Inserto: valores de T_{α} respecto a $X_{\text{copolímero}}$.....</i> | <i>151</i> |
| <i>Figura 60. Viabilidad celular determinada en el ensayo de citotoxicidad con los extractos de los films HA-Copolímero, obtenidos vía solvent casting.</i> | <i>153</i> |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|------------|
| <i>Tabla 1. Opciones del diseño y métodos de producción de los sistemas combinados, planteados en presente proyecto.</i> | <i>32</i> |
| <i>Tabla 2. Hinchamiento del PEA_X en ácido fórmico (_FA) y en acetona (_A), durante 1 y 3 días de incubación.</i> | <i>68</i> |
| <i>Tabla 3. Contenido actual de los films HA-PEA y relaciones estequiométricas entre sus componentes.</i> | <i>79</i> |
| <i>Tabla 4. Algunos parámetros de la transición vítrea de los films HA-PEA.</i> | <i>80</i> |
| <i>Tabla 5. Composición nominal de los homo- y copolímeros producidos.</i> | <i>105</i> |
| <i>Tabla 6. Composición actual de los sistemas no entrecruzados, determinada por TGA.</i> | <i>112</i> |
| <i>Tabla 7. Composición actual de los sistemas entrecruzados, determinada por TGA.</i> | <i>112</i> |
| <i>Tabla 8. Volumen específico de los sistemas entrecruzados y no entrecruzados.</i> | <i>113</i> |
| <i>Tabla 9. Valores del módulo de almacenamiento (E') en estado de vítreo y de goma, así como la temperatura de relajación principal, para los sistemas entrecruzados y no entrecruzados.</i> | <i>119</i> |
| <i>Tabla 10. Datos sobre hinchamiento de materiales en agua.</i> | <i>129</i> |

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM: Microscopía de Fuerza Atómica
BPO: Peróxido de benzoilo
CEA: 2-Carboxi acrilato de etilo
CNTs: Nanotubos de carbono
CN: Control negativo
CP: Control positivo
DEO: 1,2,7,8-Diepoxioctano
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (con o sin Rojo Fenol)
DMF: N,N-dimetilformamida
DMpT: N,N dimetil-p-toluidina
DMTA: Análisis térmico dinámico-mecánico
DSC: Calorimetría diferencial de barrido
DVS: Divinilsulfona
E': Módulo de almacenamiento
EA: Acrilato de etilo
EGDMA: Dimetilacrilato de etilenglicol
Endpoint: Temperatura final de la transición vítrea
FA: Ácido fórmico
FBS: Suero bovino fetal
FTIR: Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier
HA: Ácido hialurónico
IPNs: Redes poliméricas interpenetradas
MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2(4-sulfofenil)-2H tetrazolio
MTT: Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
OD: Densidad óptica
Onset: Temperatura de inicio de la transición vítrea
PEA: Poli(acrilato de etilo)
PBS: Tampón fosfato salino
PCEA: Poli(carboxi acrilato de etilo)
P/S: Penicilina/Estreptomicina
SEM: Microscopía electrónica de barrido
Sosa: Solución de hidróxido de sodio (NaOH)
Tan δ : Tangente de ángulo de pérdidas
TGA: Ensayo termogravimétrico
T_g: Temperatura de Transición Vítrea
THF: Tetrahidrofurano

UV: Ultravioleta

v_{sp} : Volumen específico

w/v%: concentración de la disolución (g de soluto en 100mL de solución)

X_A : fracción másica del componente A

%wt.: porcentaje másico

Δc_p : Variación de calor específico en la T_g

ΔT_g : Anchura (el rango de temperaturas) de la transición vítrea

_A: procesado con Acetona

_ES: muestra de *Electrospinning*

_FA: procesado con el Ácido fórmico

_noX: no entrecruzado (para homo-/copolímeros)

_SC: muestra de *Solvent casting*

_Sosa: procesado con Sosa

_W: procesado con Agua

_X: entrecruzado (para homo-/copolímeros)

