

<i>Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación</i>	7	9-18	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
--	---	------	---	-------------------	----------------

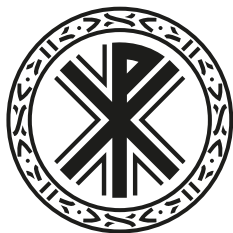
## Síntesis de biomateriales compuestos de matriz hidrófoba porosa y recubrimiento hidrófilo polimerizado por plasma para ingeniería tisular

Fecha de recepción y aceptación: 11 de noviembre de 2014, 9 de diciembre de 2014

Ángel Serrano Aroca<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Aplicadas y Tecnológicas, Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

Correspondencia: Calle Guillem de Castro, 94. 46003 Valencia. España. *E-mail*: angel.serrano@ucv.es



### ABSTRACT

A general procedure is presented to synthesise composite biomaterial systems composed of a porous hydrophobic matrix with a plasma-polymerised hydrophilic coating with applications in tissue engineering. In this work, only two types of composites were synthesized, although this procedure could be used to prepare plenty of materials of this kind. The first type of composite biomaterial has a morphology of polymethyl methacrylate microspheres joined together with interconnected pores from about 10 to 50  $\mu\text{m}$ . In addition, the second type has the great advantage of being constituted by polycaprolactone, which is a biodegradable hydrophobic polymer matrix. These reabsorbable systems showed a more irregular interconnected porosity with pores in the same range of magnitude. The hydrophilic coating was obtained by plasma polymerization in air after the necessary absorption of 2-hydroxyethyl acrylate vapour on the hydrophobic substrates. The success of the polymerization in the absence of initiator was demonstrated by direct observation through Scanning Electron Microscopy and by weight difference.

**KEYWORDS:** *plasma-polymerisation, scanning electron microscopy, polycaprolactone, polymethyl methacrylate, poly(2-hydroxyethyl acrylate).*

### RESUMEN

Se presenta un procedimiento general para sintetizar biomateriales compuestos de un soporte hidrófobo poroso con un recubrimiento hidrófilo polimerizado por plasma con aplicaciones en ingeniería tisular. En este trabajo, se han sintetizado únicamente dos tipos de biomateriales compuestos, pero de la misma forma se podría preparar infinidad de materiales de estas características. El primer tipo de material presenta una morfología de microesferas de polimetil metacrilato unidas entre sí con poros interconectados del orden de 10 a 50  $\mu\text{m}$  y el segundo tipo presenta además la gran ventaja de estar constituido por una matriz hidrófoba biodegradable, la policaprolactona, con una porosidad más irregular pero también interconectada y con poros del mismo orden de magnitud. El recubrimiento hidrófilo fue realizado absorbiendo vapor de 2-hidroxiethyl acrilato sobre ambos substratos hidrófobos y posteriormente realizando una polimerización por plasma de aire. El éxito de la polimerización por plasma en ausencia de iniciador fue demostrado mediante microscopía electrónica de barrido SEM y por diferencia de peso.

**PALABRAS CLAVE:** *polimerización por plasma, microscopía electrónica de barrido, policaprolactona, polimetil metacrilato, poli (2-hidroetil acrilato).*

## INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo se han sintetizado biomateriales con aplicaciones biomédicas en ingeniería tisular. La ingeniería tisular es una disciplina relativamente joven pero muy prometedora que combina la ciencia de materiales, la biología, la ingeniería y la medicina. Hoy en día ya es posible comprar en el mercado productos para sustituir la piel de una persona que por ejemplo ha sufrido quemaduras. Se espera que en el futuro sea posible cultivar órganos completos para sustituir los dañados accidentalmente



o por una enfermedad gracias a este nuevo campo de investigación. Estos avances pueden resolver un problema muy común hoy en día, que es la falta de donantes [1].

Esta nueva materia fue fundada a mitad del año 1980 por los americanos Joseph Vacanti, cirujano del Hospital General de Massachusetts, que estaba consternado por la falta de órganos para trasplante, y Robert Langer, bioingeniero y especialista en materiales del Instituto Tecnológico de Massachusetts, que había estado interesado durante un largo tiempo en el uso de polímeros en el cuerpo humano. Langer y Vacanti demostraron que las células del hígado cultivadas en un soporte polimérico podrían ser trasplantadas posteriormente en animales. Este descubrimiento demuestra la naturaleza básica de la ingeniería tisular: el crecimiento de células nuevas en un soporte adecuado para producir tejidos u órganos funcionales completos que pueden ser implantados en el cuerpo humano [2].

Normalmente, cuando se cultivan células, estas se suelen tomar del propio paciente, ya que así el nuevo tejido es aceptado por el cuerpo sin las complicaciones de la respuesta de rechazo inmunológico dado al utilizar células de cadáveres. Los materiales utilizados para el cultivo de células deben ser biocompatibles pero inertes ya que la respuesta inmunológica del cuerpo a implantes de cualquier tipo es crucial [1].

Para tener éxito en la regeneración de tejido, las propiedades del soporte poroso tridimensional donde las células crecen son vitales. El soporte debe consistir en un material que sea reabsorbido en el cuerpo en el tiempo conveniente, lo suficientemente lento para permitir la formación de nuevo tejido pero también lo suficientemente rápido para que no impida el crecimiento del tejido con la configuración correcta, sin dañar el cuerpo de ningún modo. Esto ha sido posible desde que Edward Schmitt y Rocca Polistina patentaron las primeras suturas absorbibles en 1963. Estas suturas estaban hechas de ácido poliglicólico (PGA) que es un polímero biodegradable comúnmente utilizado en la ingeniería tisular. Durante los años setenta y ochenta, Robert Langer había experimentado con el uso del PGA y otros polímeros para hacer cápsulas solubles que permitieran el suministro controlado de fármacos en sitios específicos del cuerpo. La solubilidad en los fluidos corporales es, sin embargo, solo una de muchas propiedades críticas. Los materiales de soporte deben también tener una estructura porosa interconectada para permitir pasar los nutrientes y los desperdicios metabólicos desde las células. Además, deben ser lo suficientemente rígidos para mantener su forma pero también han de poseer un poco de flexibilidad [3].

Siguiendo esta línea de investigación, en este trabajo se han sintetizado biomateriales porosos que pueden servir como soporte para el crecimiento *in vitro* o *in vivo* de células. Más concretamente, se trata de muestras porosas de polimetacrilato de metilo (PMMA) polimerizadas en disolución con diferentes porcentajes en peso de etanol con 1, 5 y 10% de entrecruzador de etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) y muestras porosas biodegradables de policaprolactona (PCL).

Por otra parte, los hidrogeles poseen muchas aplicaciones en ingeniería biomédica debido a su excelente biocompatibilidad y propiedades de absorción de agua [4,5]. Sin embargo, muchos de sus usos potenciales se ven obstaculizados por su baja resistencia mecánica. De este modo, se han desarrollado nuevas familias de polímeros buscando mejorar el comportamiento mecánico de los hidrogeles y, por ejemplo, estudios recientes han mostrado nuevos métodos para mejorar las propiedades mecánicas de los hidrogeles como la incorporación covalente de óxido de grafeno [6]. Esta mejora mecánica puede también lograrse a través de sistemas binarios compuestos de dos polímeros mezclados como redes de polímero interpenetradas (IPN) con dominios hidrófilos e hidrófobos [7].

En este trabajo, las propiedades mecánicas del hidrogel utilizado, el poli(2-hidroxietil acrilato) (PHEA), fueron mejoradas al inyectarlo sobre un sustrato hidrófobo poroso mediante polimerización por plasma inducido [8,11]. Para realizar este refuerzo las muestras porosas de PMMA y PCL se sitúan en un ambiente saturado del vapor de monómero 2-hidroxietil y posteriormente el vapor de monómero absorbido en la muestra polimeriza al realizarle un tratamiento de plasma de aire inducido.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales hidrófobos porosos

La síntesis de las muestras porosas de PMMA se ha llevado a cabo por polimerización con luz ultravioleta mediante moldes compuestos de dos placas de cristal cubiertas con celofán para evitar que el material se pegue en el vidrio y un cable de 1 mm de espesor en el medio dejando que sobresalgan por el lado superior los extremos de dicho cable. Las placas de cristal se sujetan mediante pinzas colocadas en su contorno.

Una vez preparados los moldes se procede a la preparación de los reactivos mezclando el monómero de metacrilato de metilo (99% de pureza de Aldrich previamente destilado) y el entrecruzador de etilenglicol dimetacrilato (98% de pureza de Aldrich previamente destilado) en las siguientes proporciones: 99-1, 95-5 y 90-10% en peso. A estas mezclas se les añade benzoina como



iniciador de la polimerización en un 0,2%. Finalmente, a estas tres mezclas iniciales se les añade etanol en un 50, 60, 70 y 80% en peso. De este modo tenemos 12 tipos de muestras porosas que se les designa como “PMMA” seguido del “% de entrecruzador”, barra “/” y el “% de etanol” con una “E” al final. Luego, las 12 muestras sintetizadas: PMMA1/50E, PMMA5/50E, PMMA10/50E, PMMA1/60E, PMMA5/60E, PMMA10/60E, PMMA1/70E, PMMA5/70E, PMMA10/70E, PMMA1/80E, PMMA5/80E y PMMA10/80E. También se ha sintetizado una muestra con un 1% de entrecruzador y un 20% de etanol (PMMA1/20E) para compararla con las muestras anteriores.

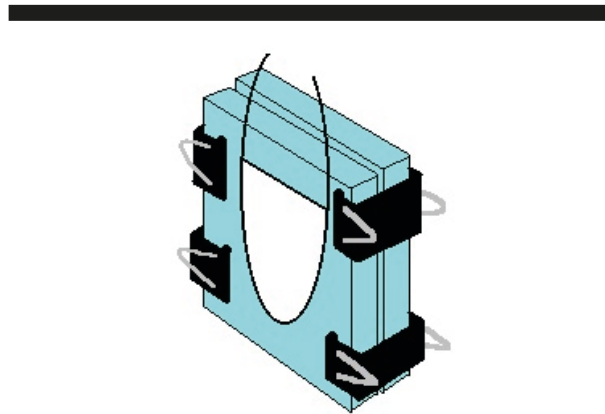


Figura 1. Molde para polimerización con luz ultravioleta.

Una vez preparadas todas las disoluciones, se procede a inyectar con una jeringuilla la mezcla preparada en los moldes y dejarlas en el horno de ultravioleta durante 24 horas.

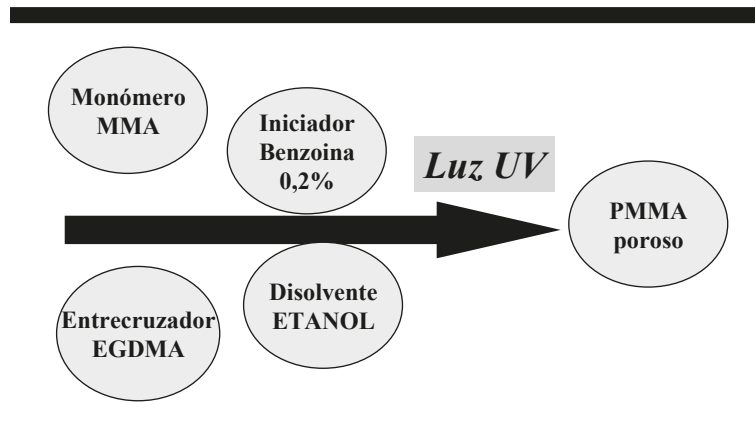


Figura 2. Polimerización con luz ultravioleta del PMMA poroso.

Una vez finalizada la polimerización se lavan las muestras con etanol hirviendo en un matraz reactor dotado con un refrigerante durante 24 horas. A continuación se dejan las muestras hinchadas a secar en el ambiente durante un día y finalmente se procede al secado a vacío durante tres días a 90 °C.

Las muestras porosas de policaprolactona se han obtenido disolviendo PCL en granza con etanol en ebullición en un matraz reactor provisto de refrigerante. Una vez disuelta la granza, la disolución se vierte en un vaso de precipitados y se deja reposar a



temperatura ambiente hasta conseguir evaporar el disolvente completamente. De esta forma, al cabo de una semana aproximadamente, en el fondo del vaso se obtiene la muestra porosa de policaprolactona.

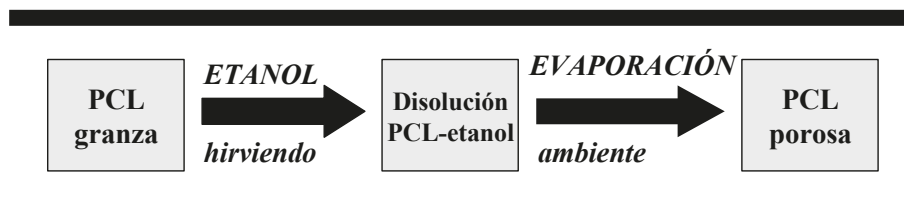


Figura 3. Proceso para la obtención de policaprolactona porosa.

### Absorción de vapor de HEA

Debido a que las muestras tienen que absorber vapor de monómero antes de realizarles el tratamiento de plasma de aire, es interesante conocer el fenómeno de absorción del monómero HEA en las muestras. Con este objetivo, se fueron tomando medidas de incremento de peso durante 156 días (más de cinco meses) en una muestra PMMA1/70E situada en un desecador con atmósfera saturada de vapor de HEA a temperatura ambiente.

### Polimerización por plasma inducido

Para conseguir un recubrimiento hidrófilo en las muestras de PMMA y de PCL, las muestras son introducidas en una atmósfera saturada de vapor de monómero de HEA, permitiéndose así la absorción de vapor de monómero por la muestra. Transcurridos dos meses y medio en el caso del PMMA u ocho días en el caso de la policaprolactona, la muestra hinchada se introduce en la cámara de plasma y se procede al tratamiento de plasma de aire con los siguientes parámetros: 110 segundos de tiempo de tratamiento, 60% de potencia (100% = 600 W), 50 Pa de presión base y 5 segundos de tiempo de homogeneización. Al introducir las muestras en la cámara de plasma, estas pierden un poco de peso al principio ya que la bomba empieza a hacer vacío en su interior hasta que se inicia el tratamiento. De este modo el HEA vapor polimerizó y se obtuvo un 25% de PHEA en las muestras de PMMA poroso y un 5,4% en la de PCL. La cantidad de PHEA obtenida depende básicamente de cuánto tiempo las muestras han estado absorbiendo vapor. La cámara de plasma utilizada para realizar los recubrimientos de PHEA en las muestras fue la Plasma-Electronic Piccolo.

### Microscopía electrónica de barrido SEM

El microscopio empleado para observar las morfologías de las muestras fue un Jeol JSM-5410 equipado con una unidad criogénica Oxford CT 1500. Las micrografías fueron tomadas a un voltaje de aceleración de 15 a 20 kV para asegurar una resolución adecuada.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Absorción de vapor de HEA

Después de tomar medidas de incremento de peso durante 156 días en una muestra PMMA1/70E situada en un desecador con atmósfera saturada de vapor de HEA a temperatura ambiente, se puede construir la siguiente isoterma de absorción mostrada en la figura 4.

Como podemos observar en la figura 4, cinco meses no es tiempo suficiente para alcanzar completamente el equilibrio, probablemente debido a condensaciones capilares.

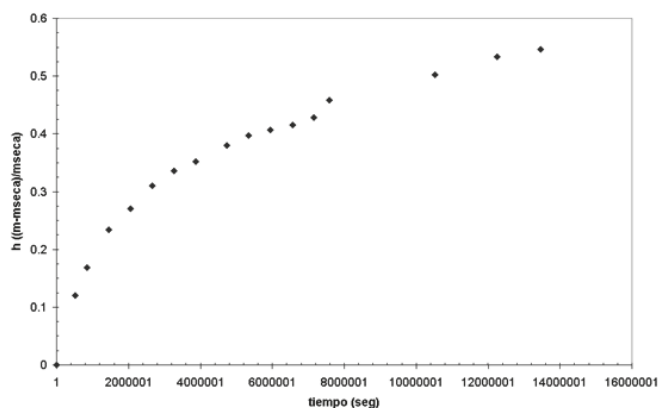


Figura 4. Curva de absorción de vapor de HEA del PMMA1/70E.

## Morfología

La morfología de las muestras observada mediante microscopía electrónica de barrido SEM nos muestra que existe una concentración límite de disolvente (60%) a partir de la cual la muestra adquiere una estructura de microesferas interconectadas (figura 5). A partir de esta composición, la porosidad aumenta con el contenido de etanol utilizado en la polimerización pero llega a resultar demasiado quebradiza la muestra para contenidos muy altos [9]. Este tipo de sistemas es muy interesante ya que son estructuras muy porosas con poros interconectados del orden de 10 a 50  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, la muestra PMMA1/20E presenta la misma estructura que la del PMMA polimerizado en bloque, observándose únicamente los defectos superficiales y la PMMA1/50E empieza a mostrar una microestructura porosa pero sin llegar a formarse microesferas.

Respecto a la influencia del contenido de entrecruzador (1, 5 o 10%) utilizado en la polimerización, se ha observado que no existe una correlación clara entre el contenido de entrecruzador y la microestructura de la muestra [10].

Por lo tanto, de todas las muestras sintetizadas, el soporte hidrófobo poroso más prometedor y en consecuencia elegido para posibles aplicaciones en ingeniería tisular fue el PMMA1/70E (figuras 5 y 6) porque presenta gran porosidad interconectada y no es tan quebradiza como las de contenido de etanol superior.

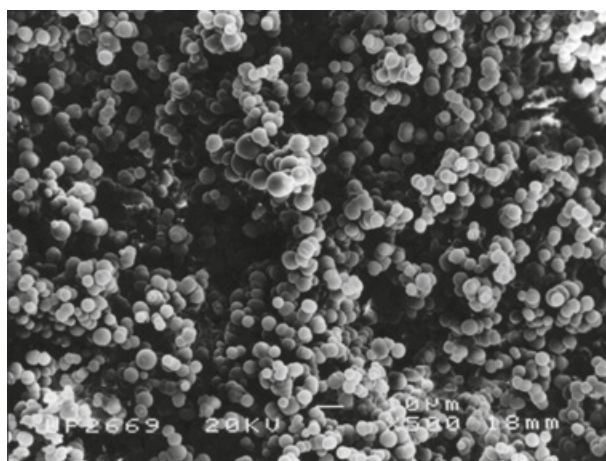


Figura 5. Micrografía SEM de la muestra PMMA1/70E a 500 aumentos.

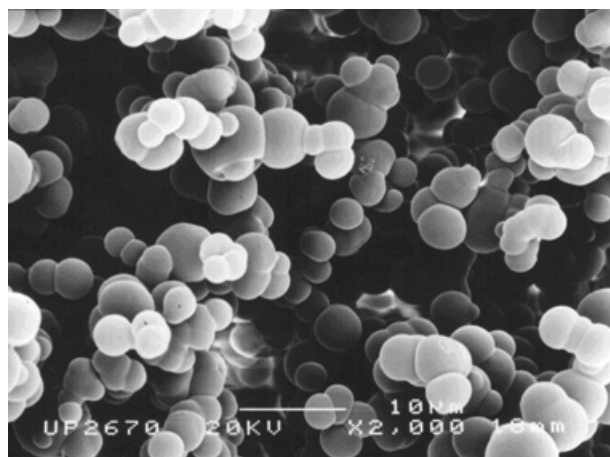


Figura 6. Micrografía SEM de la muestra PMMA1/70E a 2.000 aumentos.

Después de que la muestra PMMA1/70E absorba vapor de HEA y una vez terminado el tratamiento de plasma de aire, su morfología cambia, ya que aparece el polímero de PHEA recubriendo las microesferas de PMMA uniéndolas entre sí (figuras 7 y 8). El hecho de que el vapor de HEA polimerice sin presencia de iniciador también se ha comprobado por diferencia de peso [11].

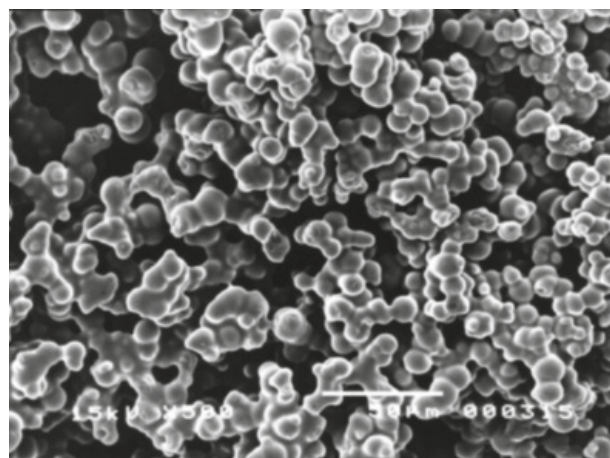


Figura 7. Micrografía SEM de la muestra PMMA1/70E con recubrimiento hidrófilo a 500 aumentos.

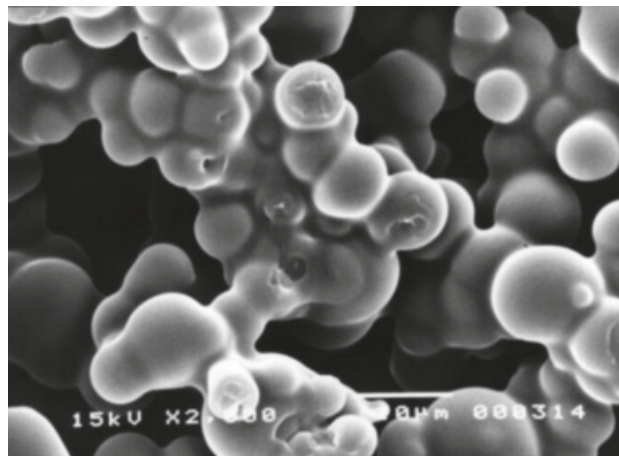


Figura 8. Micrografía SEM de la muestra PMMA1/70E con recubrimiento hidrófilo a 2.000 aumentos.

A continuación se presentan las micrografías SEM de la muestra de policaprolactona porosa en las siguientes figuras 9 y 10 a 500 y 1.000 aumentos, respectivamente.

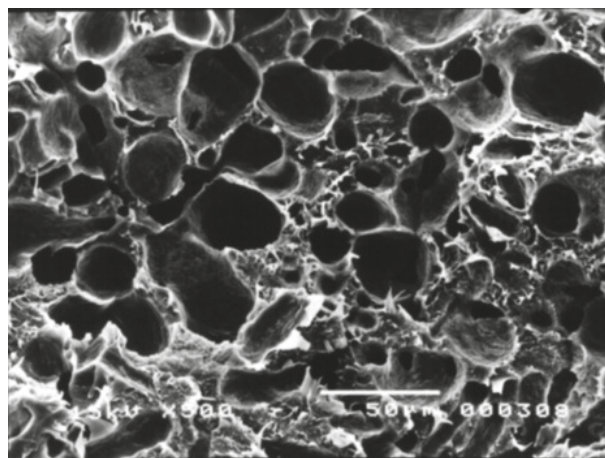


Figura 9. Muestras biodegradables de PCL porosa a 500 aumentos.



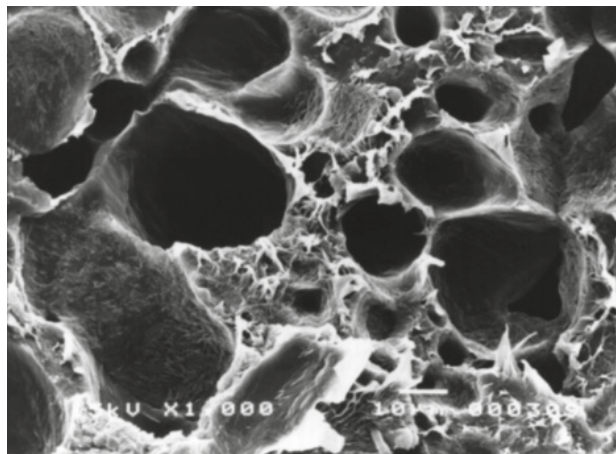


Figura 10. Muestras biodegradables de PCL porosa a 1.000 aumentos.

La policaprolactona, al igual que el PMMA, es un polímero muy hidrófobo con una absorción de agua prácticamente nula. Por este motivo, conseguir un recubrimiento hidrófilo hace cambiar sus propiedades superficiales completamente. De este modo, en las figuras 11 y 12 se muestra la morfología de estas muestras después de realizar la polimerización por plasma inducido para obtener un recubrimiento hidrófilo de PHEA sobre su superficie.

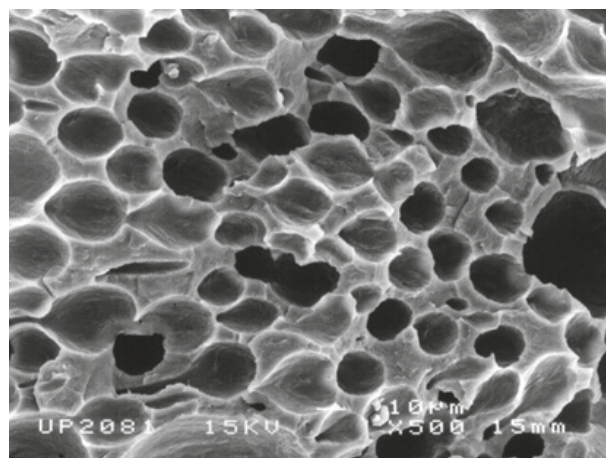


Figura 11. Muestras biodegradables de PCL porosa con recubrimiento hidrófilo a 500 aumentos.



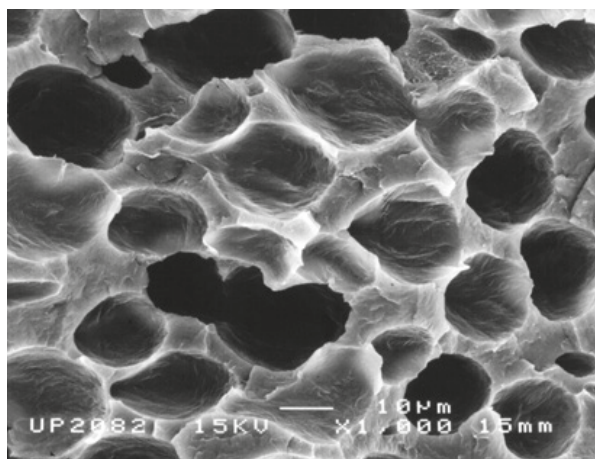


Figura 12. Muestras biodegradables de PCL porosa con recubrimiento hidrófilo a 1.000 aumentos.

Como podemos observar en la figura anterior, al igual que ocurre con el PMMA poroso, la superficie interna de la policaprolactona porosa queda superficialmente recubierta por una fina película de PHEA fácilmente identificable.

## CONCLUSIONES

Se ha realizado la síntesis de biomateriales compuestos por una matriz hidrófoba porosa de PMMA y PCL con recubrimiento hidrófilo de PHEA polimerizado por plasma inducido.

Las muestras de PMMA porosas se han sintetizado mediante polimerización en disolución con etanol utilizando benzoina como iniciador y EGDMA como entrecruzador introduciendo el molde en un horno de luz UV. Los resultados de las micrografías SEM muestran una morfología de microsferas de PMMA interconectadas cuando se usan contenidos de etanol a partir del 60% en la polimerización en disolución. De todas las muestras sintetizadas con diferentes contenidos de etanol y entrecruzador, el soporte PMMA1/70E fue el elegido para su posible aplicación en ingeniería tisular por su alta porosidad, con poros del orden de 10 a 50  $\mu\text{m}$  y al no ser tan frágiles como las polimerizadas con contenidos superiores de disolvente.

Las muestras porosas de PCL fueron preparadas siguiendo un procedimiento de disolución seguido de evaporación. Estas muestras tienen una estructura interconectada porosa más irregular, con poros del orden de 10 a 40  $\mu\text{m}$ .

Para la síntesis de los recubrimientos hidrófilos de PHEA injertados sobre ambos soportes porosos de PMMA y PCL, una vez realizado el tratamiento de plasma, el vapor de monómero HEA absorbido en el polímero polimeriza incluso en ausencia de iniciador recubriendo las microsferas de PMMA uniéndolas entre sí o recubriendo la superficie interna porosa de la PCL.

El éxito de esta polimerización por plasma del recubrimiento hidrófilo se ha demostrado por observación directa de las micrografías SEM obtenidas y por el incremento de peso entre antes de la absorción y después del tratamiento de plasma (25% de PHEA en las muestras de PMMA poroso y un 5,4% en la de PCL poroso). La cantidad de PHEA obtenida depende básicamente de cuánto tiempo las muestras han estado absorbiendo vapor.

Estos resultados son muy importantes, ya que el polímero de PMMA, al igual que el PCL, es muy hidrófobo y de este modo conseguimos introducirles grupos hidrófilos en su superficie, haciéndola más o menos hidrófila simplemente controlando el tiempo de absorción.

Además, estos tipos de síntesis constituyen un procedimiento alternativo para el refuerzo de hidrogeles que tantos problemas de resistencia mecánica presentan habitualmente.



## BIBLIOGRAFÍA

- [1] W. Charles, J. R. Patrick, A. G. Mikos y L. V. McIntire, *Frontiers in Tissue Engineering*. Elsevier Science Ltd., 1998.
- [2] C. V. Blitterswijk, Ed. In *Tissue Engineering*. Academic Press, 2008.
- [3] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, *Biomaterials Science Third edition*, Academic Press, 2013.
- [4] N. A. Peppas, Ed. In *Hydrogels in medicine and pharmacy*, vol. 3; Boca Raton, FL: CRC Press, 1987.
- [5] A. S. Hoffman, In *Hydrogels - a broad class of biomaterials*. In *Polymers in medicine and surgery*; Kronenthal, Oser, Martin, Eds.; Plenum Press: New York, 1975, 33.
- [6] C. Y. ha, S. R. Shin, X. G. Gao, N. Annabi, M. R. Dokmeci, X. W. Tang, A. Khademhosseini, *Small*, 10 (2014) 514-523.
- [7] F. O. Eschbach, S. J. Huang, In *Interpenetrating Polymer Networks*, D. Klemperer, L. H. Sperling, L. A. Utracki (Eds.), *Advances in Chemistry Series 239*, American Chemical Society, Washington, DC, Chapter 9, 1994.
- [8] N. Inagaki, *Plasma Surface Modification and Plasma Polymerization*. Technomic Publishing Company, Inc., 1996.
- [9] A. S. Aroca, M. M. Pradas, J. L. Gómez-Ribelles, *Colloid and Polym Sci* 285 (2007) 753-756.
- [10] A. S. Aroca, M. M. Pradas, J. L. Gómez-Ribelles, *Colloid and Polym Sci* 286 (2008) 209-216.
- [11] A. S. Aroca, M. M. Pradas, J. L. Gómez-Ribelles, *Polymer* 48 (2007) 2071-2078.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecer a la dirección y personal del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la Universidad Politécnica de Valencia por toda la ayuda proporcionada para la realización del presente trabajo.

