



UNIVERSIDAD NACIONAL
DE MAR DEL PLATA
.....



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA
FACULTAD DE INGENIERÍA**

**“MATRICES POLIURETÁNICAS BIORREABSORBIBLES
PARA APLICACIONES EN INGENIERÍA DE TEJIDOS”**

TESIS DOCTORAL

LIC. PABLO C. CARACCIOLO

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIA DE MATERIALES

DIRECTOR: DR. GUSTAVO A. ABRAHAM

CO-DIRECTOR: DRA. TERESITA R. CUADRADO

MAR DEL PLATA, 5 DE MARZO DE 2010



RINFI se desarrolla en forma conjunta entre el INTEMA y la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

Tiene como objetivo recopilar, organizar, gestionar, difundir y preservar documentos digitales en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Materiales y Ciencias Afines.

A través del Acceso Abierto, se pretende aumentar la visibilidad y el impacto de los resultados de la investigación, asumiendo las políticas y cumpliendo con los protocolos y estándares internacionales para la interoperabilidad entre repositorios



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

A mis padres

A mi hermana

A mis sobrinos

AGRADECIMIENTOS

A Gustavo, que siempre estuvo de manera incondicional y me guió con entusiasmo desde mucho antes de dar los primeros pasos de mi carrera científica. Este trabajo es el fruto de sus enseñanzas y sus consejos. A Fabián, cuyos consejos y buen humor hicieron del laboratorio un lugar de armonía. A Teresita, por su apoyo y su gestión en el laboratorio de Polímeros Biomédicos. A Luciana, Florencia y Cristina, mis compañeras de laboratorio, con las que he compartido buenos momentos y las idas y vueltas del trabajo experimental.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, la Universidad Nacional de Mar del Plata y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica, por la financiación del trabajo de investigación. A CONICET, por el otorgamiento de la beca doctoral que permitió llevar a cabo esta tesis.

Al Dr. Álvaro A. A. de Queiroz, de la Universidad Federal de Itajubá, Brasil, y al Dr. Vinoy Thomas, de la Universidad de Alabama, Birmingham, EEUU, por la colaboración prestada en la realización de algunos estudios.

A los miembros de mi comisión de seguimiento de tesis, Dres. Roberto Williams, Mirta Aranguren y María Alejandra Fanovich, por la lectura de informes y sugerencias realizadas.

Al personal de la División Polímeros y de INTEMA, directivos, secretaría y taller de vitroplastía. A la Dra. Sara Mendiara y al Dr. Luis Perissinotti de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

A mis amigos, Raúl, Hernán, Fernando y Luciano, ya que el trabajo hubiera sido mucho más difícil sin su compañía. A Maxi, por los buenos momentos durante la época de estudiantes.

A mis padres, ya que sin ellos nada de esto hubiera sido posible. A mi hermana, mi cuñado y mis sobrinos, por estar siempre. A Jonás, mi amigo de toda la vida.

A Paulina, que me acompañó con amor y comprensión, estimulándome durante el último período de mi tesis.

RESUMEN

Los poliuretanos segmentados son copolímeros en bloque que se emplean ampliamente como biomateriales debido a su buena biocompatibilidad y a la versatilidad química y estructural, características que posibilitan una enorme variedad de propiedades. En el campo biomédico, se aplican principalmente como elastómeros en implantes bioestables y diversos dispositivos biomédicos. Sin embargo, ciertos poliuretanos son susceptibles a degradación hidrolítica y oxidativa en condiciones fisiológicas, propiedad que permite el desarrollo de aplicaciones temporales en medicina regenerativa.

En esta tesis se presenta el diseño, síntesis, caracterización, propiedades y procesamiento de una serie de nuevos sistemas poliuretánicos biorreabsorbibles de interés para su aplicación en ingeniería de tejidos biológicos. Los polioles y extendedores de cadena empleados en la síntesis de los poliuretanos segmentados se diseñaron de manera de favorecer la separación de microfases y la formación de dominios blandos semicristalinos, y junto con el empleo de diisocianatos alifáticos, asegurar la biorreabsorbibilidad de sus subproductos de degradación no tóxicos.

Se analizó el efecto de la composición química y estructura de los extendedores de cadena y los segmentos duros en las propiedades térmicas y mecánicas de filmes. La diferente estructura química y simetría de los extendedores de cadena y segmentos duros influyó en la separación de fases. Termodinámicamente, los segmentos duros sintetizados con HDI exhibieron una menor tendencia a mezclarse con segmentos blandos de PCL que otros segmentos duros de HDI descritos en la literatura. Los materiales resultaron elastómeros blandos, como lo demuestra el estudio de sus propiedades mecánicas en tracción, carga y descarga cíclica y desgarro.

Las propiedades biológicas *in vitro* se determinaron empleando diversas técnicas de análisis, mostrando baja adhesión y activación plaquetaria, baja formación de trombos y baja citotoxicidad, propiedades que determinan a priori la buena biocompatibilidad de estos materiales.

La técnica de electrospinning permitió la preparación de matrices poliuretánicas micro/nanofibras uniformes mediante una apropiada selección de los parámetros de procesamiento y propiedades de las soluciones. Se analizaron las propiedades térmicas y mecánicas de matrices micro/nanofibras y se compararon con las propiedades de los correspondientes filmes. Las características propias de la técnica de procesamiento

condujeron a morfologías cristalinas diferentes. Las matrices presentaron una estructura altamente porosa, con poros interconectados, microestructura apropiada para aplicaciones en ingeniería de tejidos blandos y liberación controlada de principios activos.

El estudio del comportamiento degradativo de filmes y matrices porosas, tanto en condiciones fisiológicas como en ensayos acelerados, permitió evaluar la estabilidad hidrolítica y oxidativa en función de la composición, estructura y morfología de cada sistema.

Finalmente, se obtuvieron redes poliuretánicas con hidrofiliidad controlada empleando monómeros hidrofóbicos e hidrofílicos. Las propiedades térmicas y la absorción de agua de las redes se estudiaron en función de la composición de cada formulación. La presencia de entrecruzamiento químico y físico introdujo un aspecto interesante que influyó en las propiedades observadas.

ABSTRACT

Segmented polyurethanes (SPU) are block copolymers widely used as biomaterials due to their good biocompatibility and chemical and structural versatility, characteristics that allow a broad range of properties. In the biomedical field, SPU elastomers are mainly used in biostable implants and several biomedical devices. However, polyurethanes are susceptible to hydrolytic and oxidative degradation in physiological conditions, allowing the development of temporal applications for regenerative medicine.

In this thesis, the design, synthesis, characterization, properties and processing of a series of novel bioresorbable polyurethane systems is presented. These materials are of interest for applications in tissue engineering. The polyols and chain extenders used in the synthesis of SPU were designed to promote microphase separation and semicrystalline soft-domain formation. Moreover, the use of those components and aliphatic diisocyanates ensure the bioresorbability of their non toxic degradation byproducts.

The effect of chain extender and hard segment structure and chemical composition in the thermal and mechanical properties of SPU films was analyzed. The different chemical structure and symmetry of both chain extenders and hard segments affected the phase separation. Thermodynamically, the synthesized HDI-based hard segments exhibited lower phase mixing with PCL soft segments than other HDI-based hard segments reported in the literature. The materials were soft elastomers, as demonstrated by the mechanical properties in tensile, loading cycles and tear.

The *in vitro* biological properties, as determined by using several analytical techniques, displayed low platelet adhesion and activation, low thrombus formation, and low cytotoxicity, showing a priori a good biocompatibility of these materials.

The electrospinning technology allowed the preparation of micro/nanofibrous polyurethane scaffolds by an appropriate selection of the processing parameters and solution properties. Thermal and mechanical properties of these micro/nanofibrous scaffolds were analyzed and compared with the obtained for the films. The characteristics of the processing technique led to different crystalline morphologies. The scaffolds displayed a highly interconnected porous structure, microstructure useful for soft tissue engineering and drug delivery applications.

The degradative behavior of films and scaffolds were studied in physiological and accelerated conditions. The evaluation of hydrolytic and oxidative stability as a function of composition, structure and morphology of each system was performed.

Finally, polyurethane networks with controlled hydrophilicity were obtained by using hydrophilic and hydrophobic monomers. Thermal and water uptake were studied as a function of the composition for each formulation. The presence of chemical and physical crosslinking introduced an interesting feature that affected the observed properties.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	v
LISTADO DE ESQUEMAS	x
LISTADO DE FIGURAS	xii
LISTADO DE TABLAS	xv
LISTADO DE ABREVIATURAS	xvi
PUBLICACIONES	xix
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Biomateriales	2
1.2 Ingeniería de Tejidos	3
1.3 Poliuretanos	9
1.3.1 Poliuretanos segmentados (SPU)	10
1.3.2 Poliuretanos segmentados en aplicaciones biomédicas	13
1.3.2.1 Poliuretanos biorreabsorbibles	14
1.4 Procesamiento de poliuretanos para la formación de matrices porosas	16
1.5 Referencias	18
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS DE LA TESIS	24
CAPÍTULO 3: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE POLIÉSTERES ALIFÁTICOS CON ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD CONTROLADAS	27
3.1 Introducción	28
3.1.1 Reacción de polimerización por apertura de anillo (ROP)	30
3.2 Materiales y Métodos	33
3.2.1 Materiales	33
3.2.2 Síntesis de poli(ϵ -caprolactonas)	34
3.2.2.1 Síntesis de poli(ϵ -caprolactona) diol	34
3.2.2.2 Síntesis de poli(ϵ -caprolactonas) estrella	35
3.2.3 Métodos de caracterización	36
3.2.3.1 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H NMR)	36
3.2.3.2 Cromatografía de exclusión de tamaños (SEC)	37
3.2.3.3 Determinación de Mn por titulación de grupos hidroxilos terminales.	37
3.2.3.4 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	39
3.2.3.5 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)	39
3.3 Resultados y Discusión	40
3.3.1 Caracterización de poli(ϵ -caprolactona) diol	40
3.3.1.1 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H NMR)	40
3.3.1.2 Cromatografía de exclusión de tamaños (SEC)	43
3.3.1.3 Determinación de Mn por titulación de grupos hidroxilo terminales.	43
3.3.1.4 Análisis térmico por Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	44
3.3.1.5 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)	44
3.3.2 Caracterización de poliésteres estrella	45
3.3.2.1 Caracterización de poli(ϵ -caprolactona) de tres brazos	45
3.3.2.1.1 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H NMR) ...	45

3.3.2.1.2	Análisis comparativo de los resultados obtenidos mediante otras técnicas	49
3.3.2.1.3	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	50
3.3.2.2	Caracterización de poli(ϵ -caprolactona) de cuatro brazos	51
3.3.2.2.1	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H NMR) ...	51
3.3.2.2.2	Análisis comparativo de los resultados obtenidos mediante otras técnicas	56
3.3.2.2.3	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	57
3.4	Conclusiones parciales	58
3.5	Referencias	58

CAPÍTULO 4: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE EXTENDEDORES DE CADENA CON GRUPOS FUNCIONALES ESPECÍFICOS 61

4.1	Introducción	62
4.1.1	Diseño de extendedores de cadena funcionales	62
4.2	Materiales y Métodos	64
4.2.1	Materiales	64
4.2.2	Síntesis de nuevos extendedores de cadena	64
4.2.2.1	Síntesis del extendedor de cadena diurea-diol (A-H-A)	64
4.2.2.2	Síntesis del extendedor de cadena urea-diol (A-L-A)	65
4.2.2.3	Síntesis del extendedor de cadena diéster-difenol (D-E-D)	66
4.2.3	Métodos de caracterización	68
4.2.3.1	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H , ^{13}C y ^1H - ^{13}C HSQC NMR)	68
4.2.3.2	Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)	68
4.2.3.3	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	68
4.2.3.4	Solubilidad	69
4.2.3.5	Modelado de la conformación molecular de A-L-A	69
4.3	Resultados y Discusión	69
4.3.1	Caracterización del extendedor de cadena A-H-A	69
4.3.1.1	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H , ^{13}C y ^1H - ^{13}C HSQC NMR)	70
4.3.1.2	Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)	72
4.3.1.3	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	72
4.3.1.4	Solubilidad	73
4.3.2	Caracterización del extendedor de cadena A-L-A	73
4.3.2.1	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H , ^{13}C y ^1H - ^{13}C HSQC NMR)	73
4.3.2.2	Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)	78
4.3.2.3	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	79
4.3.2.4	Solubilidad	80
4.3.2.5	Modelado de la conformación molecular de A-L-A	80
4.3.3	Caracterización del extendedor de cadena D-E-D	81
4.3.3.1	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H NMR)	81
4.3.3.2	Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)	82
4.3.3.3	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	83
4.3.3.4	Solubilidad	83
4.4	Conclusiones parciales	83
4.5	Referencias	84

CAPÍTULO 5: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE POLI(ÉSTER URETANOS) Y POLI(ÉSTER URETANO UREAS) SEGMENTADOS	87
5.1 Introducción	88
5.1.1 Síntesis de poliuretanos	88
5.1.1.1 Reacciones secundarias	90
5.1.2 Propiedades cohesivas	92
5.2 Materiales y Métodos	95
5.2.1 Materiales	95
5.2.2 Síntesis de poliuretanos segmentados (SPU)	95
5.2.3 Métodos de caracterización fisicoquímica	97
5.2.3.1 Viscosidad intrínseca	97
5.2.3.2 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)	98
5.3 Resultados y Discusión	98
5.3.1 Síntesis de SPU	98
5.3.1.1 Determinación de relaciones estequiométricas óptimas	100
5.3.2 Viscosidad intrínseca de SPU	102
5.3.3 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)	103
5.3.4 Análisis de los parámetros de solubilidad	106
5.4 Conclusiones parciales	108
5.5 Referencias	108
CAPÍTULO 6: EFECTO DE LA COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA QUÍMICA DEL SEGMENTO DURO EN LAS PROPIEDADES TÉRMICAS Y MECÁNICAS DE LOS POLIURETANOS SEGMENTADOS	111
6.1 Introducción	112
6.1.1 Análisis térmico de SPU	112
6.1.2 Propiedades mecánicas de SPU	113
6.2 Métodos	115
6.2.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	115
6.2.2 Ensayos mecánicos	116
6.3 Resultados y Discusión	117
6.3.1 Propiedades térmicas	117
6.3.2 Propiedades mecánicas	122
6.3.2.1 Ensayos de tracción uniaxial	122
6.3.2.2 Ensayos de carga y descarga cíclica	125
6.3.2.3 Ensayos de desgarro	127
6.4 Conclusiones parciales	128
6.5 Referencias	128
CAPÍTULO 7: ESTUDIO DE PROPIEDADES BIOLÓGICAS <i>IN VITRO</i> DE POLIURETANOS SEGMENTADOS	132
7.1 Introducción	133
7.1.1 Interacciones superficiales con el medio biológico	133
7.1.1.1 Adhesión de proteínas	133
7.1.1.2 Adhesión, agregación y activación plaquetaria	135
7.1.1.2.1 Ensayos <i>in vitro</i>	137

7.1.1.3	Expresión de CD62P	137
7.1.1.4	Formación de trombos	138
7.1.1.5	Citotoxicidad	138
7.2	Métodos	139
7.2.1	Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)	139
7.2.2	Expresión de CD62P	141
7.2.3	Adhesión plaquetaria	141
7.2.4	Cinética de formación de trombos	142
7.2.5	Citotoxicidad	142
7.3	Resultados y Discusión	143
7.3.1	Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)	143
7.3.2	Adhesión plaquetaria	146
7.3.3	Expresión de CD62P	148
7.3.4	Cinética de formación de trombos y citotoxicidad	149
7.4	Conclusiones parciales	151
7.5	Referencias	151
 CAPÍTULO 8: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MATRICES POROSAS ELECTROHILADAS		156
8.1	Introducción	157
8.1.1	Fundamentos y aplicaciones de la técnica de <i>electrospinning</i>	158
8.1.2	Morfología de los sistemas electrohilados	160
8.1.3	Electrohilado de poliuretanos segmentados	162
8.2	Materiales y Métodos	163
8.2.1	Materiales	163
8.2.2	Preparación de matrices fibrosas	163
8.2.3	Caracterización de matrices fibrosas	164
8.2.3.1	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	164
8.2.3.2	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	164
8.2.3.3	Ensayos de tracción uniaxial	165
8.3	Resultados y Discusión	165
8.3.1	Estudio del procesamiento de PHH	165
8.3.2	Estudio del procesamiento de PHD	172
8.3.3	Propiedades térmicas	174
8.3.4	Propiedades mecánicas	177
8.4	Conclusiones parciales	178
8.5	Referencias	179
 CAPÍTULO 9: ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD HIDROLÍTICA Y OXIDATIVA DE MATRICES Y FILMES POLIURETÁNICOS		183
9.1	Introducción	184
9.1.1	Biodegradación de polímeros sintéticos	184
9.1.2	Degradación de poliuretanos	185
9.1.2.1	Efecto de la estructura de los segmentos blandos	186
9.1.2.2	Efecto de la estructura de segmentos duros	188
9.1.2.3	Estudio de la degradación de poliuretanos	189
9.2	Materiales y Métodos	190
9.2.1	Materiales	190

9.2.2 Ensayos de comportamiento hidrolítico	190
9.2.3 Ensayos de degradación acelerada	191
9.2.3.1 Degradación hidrolítica a 70 °C	191
9.2.3.2 Degradación en medio oxidativo	191
9.2.4 Cinética de absorción de agua	191
9.3 Resultados y Discusión	192
9.3.1 Cinética de absorción de agua	192
9.3.2 Evolución del pH	193
9.3.3 Comportamiento hidrolítico	195
9.3.4 Degradación acelerada	198
9.4 Conclusiones parciales	199
9.5 Referencias	200
CAPÍTULO 10: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE REDES POLIURETÁNICAS BIORREABSORBIBLES CON HIDROFILICIDAD CONTROLADA	205
10.1 Introducción	206
10.2 Materiales y Métodos	208
10.2.1 Materiales	208
10.2.2 Síntesis de redes poliuretánicas (PUN)	208
10.2.3 Métodos de caracterización fisicoquímica	209
10.2.3.1 Determinación del contenido de solubles	209
10.2.3.2 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)	210
10.2.3.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	210
10.2.3.4 Cinética de absorción de agua	210
10.3 Resultados y Discusión	211
10.3.1 Síntesis de PUN	211
10.3.2 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)	212
10.3.3 Propiedades térmicas	214
10.3.4 Cinética de absorción de agua	217
10.4 Conclusiones parciales	220
10.5 Referencias	220
CAPÍTULO 11: CONCLUSIONES FINALES	223
ANEXOS	227
Anexo I: Determinación de viscosidad intrínseca	228
Anexo II: Fundamento de las técnicas experimentales empleadas en los ensayos <i>in vitro</i>	231
AII.1 Teoría de la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)	231
AII.1.1 Aplicaciones de la SPR	233
AII.1.2 Referencias	233
AII.2 Microscopía de Epifluorescencia	233
AII.2.1 Referencias	235
AII.3 Método ELISA	235
AII.3.1 Referencias	236
AII.4 Tinción de Giemsa	236
AII.4.1 Referencias	237

LISTADO DE ESQUEMAS

Esquema 1.1: Reacción de formación de un grupo funcional uretano.....	9
Esquema 1.2: Reacción de formación de un grupo funcional urea.....	10
Esquema 3.1: Polimerización por apertura de anillo de lactonas, lactidas y glicolida.....	28
Esquema 3.2: Representación esquemática de la polimerización por apertura de anillo de un éster cíclico, donde R = (CH ₂) ₀₋₃ y/o (CHR'').....	30
Esquema 3.3: Mecanismos de polimerización por apertura de anillo: a) catiónica, b) aniónica y c) vía coordinación-inserción.....	31
Esquema 3.4: Estructura química de 2-etilhexanoato de estaño.....	32
Esquema 3.5: Mecanismos principales de ROP propuestos con Sn(Oct) ₂ como catalizador: a) complejación de un monómero y un alcohol antes de ROP de ε-CL y b) formación de un alcóxido de estaño antes de ROP de ε-CL.....	33
Esquema 3.6: Síntesis de PCL diol partir de ε-CL y TEG.....	34
Esquema 3.7: Polimerización de ε-CL iniciada por glicerol.....	35
Esquema 3.8: Polimerización de ε-CL iniciada por pentaeritritol.....	36
Esquema 3.9: Esterificación de hidroxilos terminales con anhídrido acético.....	37
Esquema 3.10: Titulación del exceso de anhídrido acético hidrolizado.....	38
Esquema 3.11: Esterificación de hidroxilos terminales con anhídrido ftálico.....	38
Esquema 3.12: Titulación del exceso de anhídrido ftálico hidrolizado.....	39
Esquema 3.13: Estructuras químicas de TEG a) disustituido y b) monosustituido con PCL, esterificado con anhídrido acético en ambos casos, mostrando las asignaciones del espectro ¹ H NMR.....	41
Esquema 3.14: Estructuras químicas de glicerol a) trisustituido, b) disustituido y c) monosustituido con policaprolactona, mostrando las asignaciones del espectro ¹ H NMR.....	46
Esquema 3.15: Estructuras químicas de pentaeritritol a) tetrasustituido, b) trisustituido y c) disustituido con policaprolactona, mostrando las asignaciones del espectro ¹ H NMR.....	52
Esquema 4.1: Síntesis de extendedor de cadena diurea-diol.....	65
Esquema 4.2: Síntesis de extendedor de cadena urea-diol (estructura química esperada).....	65
Esquema 4.3: Síntesis de extendedor de cadena diéster-difenol.....	67
Esquema 4.4: Estructura química de A-H-A mostrando las asignaciones de ¹ H (letras) y ¹³ C (números) en los espectros de NMR.....	71
Esquema 4.5: a) Estructura química del intermediario del diol A-L-A; b) Estructura química del compuesto diurea-diol A-L-A (confirmada espectroscópicamente).....	74
Esquema 4.6: Estructura química de A-L-A mostrando la asignación de ¹ H (letras) y ¹³ C (números) en los espectros de NMR.....	74
Esquema 4.7: Estructura química del compuesto intermediario diurea, mostrando la asignación de ¹ H (letras) y ¹³ C (números) en los espectros de NMR.....	78
Esquema 4.8: Estructura química del compuesto diéster-difenol D-E-D.....	81
Esquema 5.1: Síntesis de poliuretanos por el método de dos etapas.....	89
Esquema 5.2: Reacciones secundarias debidas al extendedor de cadena: a) transesterificación y b) aminólisis.....	90
Esquema 5.3: Reacciones secundarias en las que participa el grupo isocianato: a) formación de alofanatos, b) formación de biurets.....	91
Esquema 5.4: Reacciones de isocianatos. Formación de a) uretidina-dionas y b) isocianuratos.....	92
Esquema 5.5: Ruta sintética de dos etapas seguida para la obtención de los SPU.....	96
Esquema 5.6: Estructuras químicas de los diisocianatos alifáticos HDI y LDI.....	102

Esquema 5.7: Estructuras químicas propuestas para los dominios de segmentos duros producidos por interacción por puente de hidrógeno en a) PHH y b) PHL, e interacción por puente de hidrógeno y entre nubes π -electrónicas en c) PHD.....	106
Esquema 6.1: Probeta empleada en el ensayo de desgarro y diferentes modos de propagación del desgarro: a) correcto, b) y c) incorrectos.....	116
Esquema 9.1: Susceptibilidad hidrolítica de diferentes grupos funcionales.....	188
Esquema 9.2: Reacción de Weiss-Haber.....	189
Esquema 10.1: Ejemplo de síntesis de una red poliuretánica a partir de LDI y glicerol.....	206
Esquema 10.2: Síntesis de PUN con polioles hidrofílicos difuncionales e hidrofóbicos trifuncionales (entrecruzante químico).....	209
Esquema AII.1: a) Configuración de Kretschmann de un equipo de SPR; b) Ejemplos típicos de curvas de SPR, antes (I) y después (II) de adsorción proteica.....	232
Esquema AII.2: Funcionamiento de un microscopio de epifluorescencia.....	234

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1: Estrategias seguidas con diferentes matrices para ingeniería de tejidos.....	6
Figura 1.2: Representaciones de un SPU: a) esquema de la microestructura en un SPU y b) formación de dominios semicristalinos separados.....	11
Figura 3.1: Espectro ^1H NMR de PCL diol.....	42
Figura 3.2: Termograma de PCL diol.....	44
Figura 3.3: Espectro infrarrojo de PCL diol.....	45
Figura 3.4: Espectro de ^1H NMR de PCL estrella con relación $[\varepsilon\text{-CL:OH}]$ de [8:1].....	47
Figura 3.5: Espectros de ^1H NMR de los compuestos PCL estrella iniciados por glicerol con diferentes relaciones estequiométricas de $[\varepsilon\text{-CL:OH}]$ en la región que permite determinar los porcentajes de especies con distinto número de brazos. a_1 , a_2 y a_3 corresponden a los hidrógenos de grupos metino de glicerol mono, di y trisustituido.....	49
Figura 3.6: Espectro de ^1H NMR de PCL estrella con relación $[\varepsilon\text{-CL:OH}] = [8:1]$	53
Figura 3.7: Espectros de ^1H NMR de PCL estrella iniciadas por pentaeritritol con diferentes relaciones estequiométricas de $[\varepsilon\text{-CL:OH}]$ en la región que permite determinar los porcentajes de especies con distinto número de brazos. a , b y c corresponden a hidrógenos de grupos metileno adyacentes a grupos hidroxilo terminales.....	55
Figura 4.1: Síntesis de extendedor de cadena diéster-difenol.....	67
Figura 4.2: Espectros de: a) ^1H RMN y b) ^{13}C NMR de A-H-A.....	70
Figura 4.3: Espectro ^1H - ^{13}C HSQC NMR de A-H-A.....	71
Figura 4.4: Espectro infrarrojo de A-H-A.....	72
Figura 4.5: Termograma del compuesto A-H-A.....	73
Figura 4.6: Espectros de: a) ^1H NMR y b) ^{13}C NMR de A-L-A.....	75
Figura 4.7: Espectro ^1H - ^{13}C HSQC NMR de A-L-A.....	76
Figura 4.8: Espectros de: a) ^1H NMR y b) ^{13}C NMR del compuesto intermediario diurea.....	77
Figura 4.9: Espectro infrarrojo de A-L-A.....	78
Figura 4.10: Termograma del compuesto A-L-A.....	79
Figura 4.11: Conformación molecular del compuesto A-L-A.....	80
Figura 4.12: Espectro ^1H RMN de D-E-D.....	82
Figura 4.13: Espectro FTIR del diéster-difenol D-E-D.....	82
Figura 4.14: Termograma del compuesto D-E-D.....	83
Figura 5.1: Variación de la viscosidad intrínseca en función de la relación estequiométrica r para a) PHL y b) PLL.....	101
Figura 5.2: Espectros de ATR-FTIR de los SPU de la Serie H: a) PHH, b) PHL y c) PHD.....	104
Figura 5.3: Espectros de ATR-FTIR de los SPU de la Serie L: a) PLH, b) PLL y c) PLD.....	104
Figura 6.1: Termogramas de DSC de los SPU de la Serie H: a) PHH, b) PHL y c) PHD.....	121
Figura 6.2: Termogramas de DSC de los SPU de la Serie L: a) PLH, b) PLL y c) PLD.....	122
Figura 6.3: Curvas de tensión-deformación en tracción representativas para los SPU de la Serie H. Recuadro: Curvas de tensión-deformación para los SPU de las Series H y L en la región de bajas deformaciones.....	124
Figura 6.4: Curvas de tensión-deformación en tracción para a) PHH y b) PHL. Los números en las curvas de PHL indican: (1) región elástica, (2) descarga posterior a la fluencia, (3) carga del segundo ciclo, (4) descarga del segundo ciclo, y (5) carga del tercer ciclo.....	126
Figura 7.1: Plaquetas observadas con un microscopio electrónico.....	135

Figura 7.2: a) Equipo Balzer PLS500 empleado para la preparación de electrodos de oro. b) Sustratos de vidrio recubiertos con oro (espesor = 65 nm).....	140
Figura 7.3: Espectros de SPR para filmes de PHL luego de contacto con a) seroalbúmina humana (HSA) y b) fibrinógeno humano (HFb). Concentración de HSA: 4.2 g.dl ⁻¹ , concentración de HFb: 0.24 g.dl ⁻¹ , Temperatura: 37 °C. Las concentraciones de proteínas y la temperatura son similares a las del cuerpo humano.....	144
Figura 7.4: Adsorción de: a) seroalbúmina humana (HSA) y b) fibrinógeno humano (HFb), en filmes de PHH, PHL y PHD medida por SPR a 37 °C.....	145
Figura 7.5: Imágenes de microscopía de epifluorescencia de plaquetas sobre a) vidrio y filmes de b) PHH y c) PHL luego de exposición a sangre humana (x 1000).....	146
Figura 7.6: Relación de área cubierta por plaquetas por unidad de área (100,000 μm ²) sobre las superficies de los sustratos recubiertos con PHH, PHL y PHD luego de incubación con PRP.....	147
Figura 7.7: Micrografías SEM de plaquetas sanguíneas a) y b) activadas sobre superficies de vidrio, y sin activar sobre recubrimientos de c) PHH y d) PHL, luego de incubación con sangre humana a 37 °C por 15 minutos.....	148
Figura 7.8: Expresión de plaquetas positivas CD62P (%). Vidrio y Si-mg son los controles positivo y negativo, respectivamente.....	149
Figura 7.9: Cinética de formación de trombos sobre las superficies de filmes de PHL, PHH y PHD.....	150
Figura 7.10: Citotoxicidad de los extractos de SPU, control negativo (UHMWPE) y control positivo (fenol) empleando células de ovario de Hamster Chino (CHO).....	150
Figura 8.1: Equipo básico para la técnica de electrospinning.....	158
Figura 8.2: Diagrama cualitativo mostrando el efecto de <i>C</i> y <i>Be</i> en la morfología para electrospinning de PCL con distinto Mn.....	161
Figura 8.3: Equipo de electrospinning construido en nuestro laboratorio.....	164
Figura 8.4: Micrografías SEM (x1000) de PHH electrohilado empleando $\nu = 1 \text{ ml.h}^{-1}$, a) <i>C</i> = 30 % p/v en DMAc, <i>V</i> = 12 kV, <i>h</i> = 15 cm, b) <i>C</i> = 20 % p/v en DMAc/Ac (60/40), <i>V</i> = 20 kV, <i>h</i> = 15 cm, c) <i>C</i> = 20 % p/v en DMF/THF (50/50), <i>V</i> = 20 kV, <i>h</i> = 15 cm.....	167
Figura 8.5: Confórmeros del 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP).....	168
Figura 8.6: Micrografías SEM de PHH electrohilado a partir de soluciones de HFIP empleando $\nu = 1 \text{ ml.h}^{-1}$, <i>V</i> = 15 kV, <i>h</i> = 15 cm, a) <i>C</i> = 10 % p/v; b) <i>C</i> = 15 % p/v; c) <i>C</i> = 20 % p/v; d) distribución de diámetros de fibras correspondiente a la matriz mostrada en c).....	169
Figura 8.7: Micrografía SEM de PHH electrohilado a partir de una solución de HFIP de <i>C</i> = 20 % p/v, empleando <i>h</i> = 15 cm, $\nu = 1 \text{ ml.h}^{-1}$ y <i>V</i> = 10 kV.....	170
Figura 8.8: Micrografías SEM de PHH electrohilado a partir de soluciones de HFIP empleando <i>C</i> = 20 % p/v, <i>h</i> = 15 cm, a) $\nu = 2 \text{ ml.h}^{-1}$, <i>V</i> = 15 kV; b) $\nu = 3 \text{ ml.h}^{-1}$, <i>V</i> = 15 kV; c) distribución de diámetros de fibras correspondiente a la matriz mostrada en b).....	171
Figura 8.9: Micrografías SEM de PHD electrohilado a partir de soluciones de DMF/THF (50/50) empleando $\nu = 1 \text{ ml.h}^{-1}$, a) <i>C</i> = 10 % p/v, <i>V</i> = 20 kV, <i>h</i> = 15 cm; b) <i>C</i> = 20 % p/v, <i>V</i> = 15 kV, <i>h</i> = 10 cm; c) <i>C</i> = 30 % p/v, <i>V</i> = 20 kV, <i>h</i> = 15 cm; d) distribución de diámetros de fibras correspondiente a la matriz mostrada en c).....	172
Figura 8.10: Micrografías SEM de PHD electrohilado a partir de soluciones de HFIP empleando <i>V</i> = 15 kV, <i>h</i> = 15 cm, a) $\nu = 0.5 \text{ ml.h}^{-1}$, <i>C</i> = 20 % p/v; b) $\nu = 1 \text{ ml.h}^{-1}$, <i>C</i> = 20 % p/v; c) $\nu = 2 \text{ ml.h}^{-1}$, <i>C</i> = 20 % p/v; d) $\nu = 1 \text{ ml.h}^{-1}$, <i>C</i> = 15 % p/v. El recuadro en d) muestra la formación de gotas a $\nu = 1 \text{ ml.h}^{-1}$, <i>C</i> = 10 % p/v.....	173
Figura 8.11: Termogramas de DSC de los filmes de SPU y sus matrices electrohiladas.....	176
Figura 8.12: Curvas de tensión-deformación en tracción de a) matrices electrohiladas, b) comparación de matrices electrohiladas con filmes.....	178
Figura 9.1: Cinética de absorción de agua en PBS a 37 °C de filmes de SPU (Series H y L) y PCL diol 42,5 kDa.....	192

Figura 9.2: Variación de pH en el medio de degradación hidrolítica de filmes de SPU (Series H y L) y PCL diol 42,5 kDa.....	194
Figura 9.3: Comparación de la variación de pH en el medio de degradación hidrolítica de las matrices electrohiladas y los filmes de PHH y PHD.....	194
Figura 9.4: Degradación hidrolítica en PBS a 37 °C de filmes de SPU (Series H y L) y PCL diol 42,5 kDa.....	195
Figura 9.5: Degradación hidrolítica en PBS a 37 °C de matrices electrohiladas de PHH y PHD.....	196
Figura 9.6: Comparación de la degradación hidrolítica en PBS a 37 °C entre matrices electrohiladas y filmes.....	197
Figura 10.1: Espectros ATR-FTIR de las redes poliuretánicas PCL-PEG ₄₀₀ . Serie PUN ₁₀₆₀ : a) región de metilenos y b) región de carbonilos; Serie PUN ₃₁₃₀ : c) región de metilenos y d) región de carbonilos.....	213
Figura 10.2: Termogramas DSC de las redes poliuretánicas PCL-PEG ₄₀₀ : a) Serie PUN ₁₀₆₀ , b) Serie PUN ₃₁₃₀ , c) Serie PUN ₉₀₀ . Se muestran también los termogramas de los polioles PCL triol de distinto peso molecular y PEG ₄₀₀	215
Figura 10.3: Variación de T_g de redes poliuretánicas en función del contenido de PCL triol de distintos pesos moleculares: PUN ₉₀₀ (▲), PUN ₁₀₆₀ (●) y PUN ₃₁₃₀ (■). Se muestran también los valores de T_g de los polioles PCL triol de distinto peso molecular y PEG ₄₀₀ (recuadros con símbolos abiertos).....	216
Figura 10.4: Curvas de absorción de agua a 37°C de las redes poliuretánicas PCL-PEG ₄₀₀ ; a) Serie PUN ₃₁₃₀ , b) Serie PUN ₉₀₀	219
Figura 10.5: Valores de hinchamiento de equilibrio para las redes poliuretánicas PCL-PEG en función del contenido de PCL triol en el componente hidroxilado: PUN ₉₀₀ (▲), PUN ₁₀₆₀ (●) y PUN ₃₁₃₀ (■).....	219
Figura AII.1: Pasos para la realización de un ELISA sandwich.....	236

LISTADO DE TABLAS

Tabla 3.1: Resultados obtenidos mediante ¹ H NMR para PCL diol iniciada por TEG.....	42
Tabla 3.2: Datos de la caracterización de PCL diol.....	44
Tabla 3.3: Resultados obtenidos por ¹ H NMR para los polímeros iniciados por glicerol.....	48
Tabla 3.4: Valores de pesos moleculares obtenidos por diferentes técnicas para PCL estrella iniciadas por glicerol.....	50
Tabla 3.5: Propiedades térmicas de PCL iniciadas por glicerol.....	51
Tabla 3.6: Resultados obtenidos por ¹ H NMR para los polímeros iniciados por pentaeritritol.....	54
Tabla 3.7: Valores de pesos moleculares obtenidos por diferentes técnicas para PCL estrella iniciadas por pentaeritritol.....	56
Tabla 3.8: Propiedades térmicas de PCL iniciada por pentaeritritol.....	57
Tabla 5.1: Contenido de segmentos duros y viscosidad intrínseca de los SPU sintetizados (Series H y L).....	103
Tabla 5.2: Parámetros de solubilidad para diferentes segmentos y compuestos.....	107
Tabla 6.1: Propiedades térmicas de los SPU sintetizados (Series H y L).....	118
Tabla 6.2: Propiedades térmicas y mecánicas de SPU formulados con PCL ₂₀₀₀ diol reportados en la literatura para aplicaciones biomédicas.....	120
Tabla 6.3: Propiedades mecánicas de los SPU determinadas mediante ensayos de tracción uniaxial.....	122
Tabla 8.1: Propiedades de algunos solventes orgánicos empleados en electrospinning.....	158
Tabla 8.2: Propiedades térmicas de los filmes de SPU y sus matrices electrohiladas.....	176
Tabla 8.3: Propiedades mecánicas de los filmes de SPU y sus matrices electrohiladas.....	177
Tabla 9.1: Degradación acelerada de los SPU sintetizados (Series H y L) y de PCL diol 42,5 kDa... ..	198
Tabla 10.1: Características estructurales de las PCL triol PCL ₁₀₆₀ y PCL ₃₁₃₀ empleadas en la síntesis de PUN (ver Tabla 3.3).....	211
Tabla 10.2: Contenido de sol (%) para las PUN sintetizadas.....	212
Tabla AII.1. Coloraciones esperadas empleando solución amortiguadora de fosfatos a pH 6,8.....	237

LISTADO DE ABREVIATURAS

Ac	acetona
ACD/HNMR	software de Advanced Chemistry Development Inc.
AE	2-aminoetanol
A-H-A	extendedor de cadena conformado por AE y HDI
A-L-A	extendedor de cadena conformado por AE y LDI
ASTM	American Society for Testing and Materials
BDI	1,4-butanodiisocianato
BDO	1,4-butanodiol
CD62P	expresión de P-selectina
CHO	células de ovario de Hamster Chino
CMF-PBS	solución salina buffer fosfato, libre de calcio y magnesio
Da	unidad de masa molar, Dalton, Da = g/mol
DAT	ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico (desaminotirosina)
DBTDL	dibutildilaurato de estaño
D-E-D	extendedor de cadena conformado por EG y DAT
DEG	dietilenglicol
D,L-LA	ácido D,L -láctico
DMAc	<i>N,N'</i> -dimetilacetamida
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DSC	calorimetría diferencial de barrido
E	módulo de elasticidad o módulo de Young
EG	etilenglicol
ELISA	ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
f_e	funcionalidad efectiva
f_t	funcionalidad teórica
GA	ácido glicólico
G _t	energía de desgarro
HDI	1,6-hexametilendiisocianato
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
HFb	fibrinógeno humano
¹ H-NMR	resonancia magnética nuclear de protón
HSA	seroalbúmina humana
¹ H- ¹³ C HSQC	Experimento de coherencia heteronuclear (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
IC ₅₀	índice de citotoxicidad
IP	2-propanol o isopropanol

LDI	2,6-diisocianatohexanoato de metilo (metil éster de diisocianato de L-lisina)
L-LA	ácido L -Láctico
L_n	longitud promedio de cadena
MDI	difenilmetanodiisocianato
MEM-FBS	medio de cultivo Eagle con suero de feto bovino y solución de penicilina y estreptomycin
Mn	peso molecular promedio en número
Mn_t	peso molecular promedio en número teórico
Mw	peso molecular promedio en peso
PBS	solución buffer fosfato
PCL	policaprolactona
PEG	poli(etilen glicol)
PEO	poli(óxido de etileno)
PGA	poli(ácido glicólico)
PHD	poliuretano formulado con PCL, HDI y D-E-D
PHH	poliuretano formulado con PCL, HDI y A-H-A
PHL	poliuretano formulado con PCL, HDI y A-L-A
PLD	poliuretano formulado con PCL, LDI y D-E-D
PLGA	poli(ácido láctico glicolico)
PLH	poliuretano formulado con PCL, LDI y A-H-A
PLL	poliuretano formulado con PCL, LDI y A-L-A
PLLA	poli(ácido L -láctico)
PRP	plasma rico en plaquetas
PTMG	politetrametilenéterglicol
p-TsOH	ácido p-toluensulfónico
ROP	polimerización por apertura de anillo
SEC	cromatografía de exclusión de tamaños
SEM	microscopía electrónica de barrido
Si-gm	silicona de grado médico
Sn(Oct) ₂	etilhexanoato de estaño (octoato de estaño)
SPR	resonancia de plasmón superficial
SPU	poliuretano segmentado
SPUU	poli(uretano urea) segmentado
TEG	trietilenglicol
T_g	temperatura de transición vítrea
THF	tetrahidrofurano
T_m	temperatura de fusión
UHMWPE	polietileno de ultra alto peso molecular
X_c	porcentaje de cristalinidad

δ	parámetro de solubilidad
ΔH_c	entalpía de cristalización
ΔH_m	entalpía de fusión
ε -CL	ε -caprolactona
ε_u	deformación última
ε_y	deformación de fluencia
$[\eta]$	viscosidad intrínseca
σ_u	tensión última o tensión de rotura
σ_y	tensión de fluencia

Esta tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones científicas con referato:

1. G.A. Abraham, P.C. Caracciolo, F. Buffa, T.R. Cuadrado. “Diseño y Preparación de Matrices Poliméricas Porosas para Ingeniería de Tejidos Biológicos”. *Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 59, 115-130, **2007**. ISSN 0365-1185.

2. P.C. Caracciolo, A.A.A de Queiroz, O.Z. Higa, F. Buffa, G.A. Abraham. “Segmented poly(esterurethane urea)s from novel urea-diol chain extenders: synthesis, characterization and *in vitro* biological properties”. *Acta Biomaterialia* 4 (4), 976 – 988, **2008**. ISSN: 1742-7061.

3. P.C. Caracciolo, F. Buffa, G.A. Abraham. “Effect of the hard segment chemistry and structure on the thermal and mechanical properties of novel biomedical segmented poly(esterurethanes)”. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20 (1), 145-155, **2009**. ISSN: 0957-4530.

4. P.C. Caracciolo, V. Thomas, Y.K. Vohra, F. Buffa, G.A. Abraham. “Electrospinning of novel biodegradable poly(ester urethane)s and poly(ester urethane urea)s for soft tissue-engineering applications”. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20 (10) 2129-2137, **2009**. ISSN: 0957-4530.

En preparación:

5. P.C. Caracciolo, V. Thomas, F. Buffa, G.A. Abraham. “Hydrolytic and swelling behaviour of novel electrospun poly(ester urethane)s and poly(ester urethane urea)s”. *Manuscrito en preparación*.

6. C. Sanz Pita, P.C. Caracciolo, F. Buffa, G.A. Abraham. “Amphiphilic elastomeric polyurethane networks: thermal and swelling behavior”. *Manuscrito en preparación*.

Se han presentado los siguientes trabajos en congresos nacionales e internacionales:

1. *Jornadas XXV años de la Sociedad Argentina de Bioingeniería*, SABI. 20 – 22 de noviembre, **2004**, Mar del Plata, Argentina. G.A. Abraham, F. Buffa, P.C. Caracciolo, T.R. Cuadrado. “Desarrollo de sistemas poliméricos y nuevos biomateriales para regeneración de tejidos”. Póster.

2. *XV Simposio Nacional de Química Orgánica*, XV SINAQO. 6 – 8 de noviembre, **2005**. Mar del Plata, Argentina. P.C. Caracciolo, F. Buffa, G.A. Abraham. “Síntesis y caracterización de poliésteres tipo estrella mediante polimerización por apertura de anillo”. Póster. SO-31.

3. *III Argentine-Chilean Polymer Symposium*, III ARCHIPOL. 4 – 7 de diciembre, **2005**. Los Cocos, Córdoba, Argentina. P.C. Caracciolo, F. Buffa, T.R. Cuadrado, G.A. Abraham. “Síntesis y caracterización de poliésteres tipo estrella precursores de poliuretanos biodegradables”. Póster. P1.C34

4. *World Polymer Congress MACRO2006*. 16 – 21 de julio, **2006**. Rio de Janeiro, Brasil. P.C. Caracciolo, F. Buffa, T.R. Cuadrado, G.A. Abraham. “Biodegradable segmented poly(ester urethane urea)s from novel diurea diol chain extenders”. Póster N°1378
5. *Taller Nacional de Ciencia e Ingeniería de Materiales TANAMAT 2007 y 2do Taller de Enseñanza de la Ciencia e Ingeniería de Materiales*. 19 y 20 de octubre, **2007**. Mar del Plata, Argentina. P.C. Caracciolo, F. Buffa, G.A. Abraham. “Desarrollo de sistemas poliuretánicos biocompatibles para regeneración y reparación de tejidos”. Comunicación oral. CD p.38-39.
6. *XVI Simposio Nacional de Química Orgánica, XVI SINAQO*. 11 – 14 de noviembre, **2007**. Mar del Plata, Argentina. P.C. Caracciolo, A.A.A de Queiroz, F. Buffa, G.A. Abraham. “Urea-dioles alifáticos: síntesis, caracterización y propiedades”. Póster. SO-34
7. *IV Simposio Chileno-Argentino de Polímeros, IV ARCHIPOL*. 2 – 5 de diciembre, **2007**. Viña del Mar, Chile. P.C. Caracciolo, F. Buffa, G.A. Abraham. “Efecto del extendedor de cadena en las propiedades térmicas y mecánicas de poli(éster uretanos) de interés biomédico”. Comunicación oral. CO97-AB
8. *IV Simposio Chileno-Argentino de Polímeros, IV ARCHIPOL*. 2 – 5 de diciembre, **2007**. Viña del Mar, Chile. P.C. Caracciolo, A.A.A de Queiroz, O.Z. Higa, G.A. Abraham. “Estudio de propiedades biológicas in vitro de poli(éster uretano ureas) segmentados”. Póster. SP98-AB
9. *V Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, V COLAOB*. 22 – 25 de Junio, **2008**. Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. P.C. Caracciolo, A.A.A de Queiroz, G.A. Abraham. “Poly(esterurethane urea)s for soft tissue engineering applications: Evaluation of biological properties”. Póster. D501
10. *Segundo Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales*. 18 y 19 de octubre, **2008**. Posadas, Misiones, Argentina. P.C. Caracciolo, F. Buffa, G.A. Abraham. “Matrices poliuretánicas nanofibras obtenidas por el proceso de electrospinning”. Póster. p.111
11. *1º Taller de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos, BIOOMAT*. 25 – 27 de agosto, **2009**. Rosario, Santa Fé, Argentina. P.C. Caracciolo, F. Buffa, G.A. Abraham. “Development of polyurethane scaffolds for soft-tissue engineering applications”. Póster con presentación oral.
12. *V Simposio Chileno-Argentino de Polímeros, V ARCHIPOL*. 18 – 21 de octubre, **2009**. Los Cocos, Córdoba, Argentina. P.C. Caracciolo, F. Buffa, G.A. Abraham. “Optimization of the electrospinnability conditions of biomedical polyurethanes”. Comunicación oral.
13. *V Congreso Internacional de Biomateriales, BIOMAT’ 2010*. 17 – 19 de marzo, **2010**. La Habana, Cuba. P.C. Caracciolo, F. Buffa, V. Thomas, Y. Vohra, G.A. Abraham. “Hydrolytic stability, thermal and swelling behavior of highly porous and non-porous biomedical polyurethanes”. Comunicación oral. Aceptado.
14. *V Congreso Internacional de Biomateriales, BIOMAT’ 2010*. 17 – 19 de marzo, **2010**. La Habana, Cuba. C. Sanz Pita, P.C. Caracciolo, F. Buffa, G.A. Abraham.

“Amphiphilic elastomeric polyurethane networks: thermal and swelling behavior”.
Póster. Aceptado.

15. *VI Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais*, VI COLAOB. 17 – 20 de agosto, **2010**. Gramado, Rio Grande do Sul, Brasil. P.C. Caracciolo, F. Buffa, V. Thomas, Y. Vohra, G.A. Abraham. “Characterization of elastomeric electrospun polyurethane scaffolds”. Comunicación oral. Enviado.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Biomateriales

La Sociedad Europea de Biomateriales planteó en 1987 un debate para consensuar una definición de biomaterial que reuniera la aceptación de la comunidad científica internacional. Se determinó entonces que un biomaterial es *un material no vivo usado en un dispositivo médico, destinado a interactuar con el sistema biológico* [1]. Esta definición se modificó en 1992, eliminando la referencia a la naturaleza no viviente del material [2]. Posteriormente en 1999, se definió como *un material destinado a interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo* [3]. De esta manera, el concepto de biomaterial estaba asociado solamente al ámbito de la salud humana y a la interacción con los tejidos o componentes tisulares. Un material biomédico es un biomaterial, aunque este último término es más usado por su brevedad.

La evolución de la ciencia de materiales y las tecnologías relacionadas con la salud tornaron obsoleta esta definición. Las situaciones en las que los biomateriales se usan actualmente son muy diferentes de las de una década atrás. Aunque los dispositivos médicos implantables son aún inmensamente importantes, las tecnologías médicas ahora comprenden una variedad de sistemas de liberación de drogas y fármacos, ingeniería de tejidos y terapias celulares, diseño de órganos y patrones celulares, nanotecnología basada en sistemas de imágenes y diagnóstico y dispositivos microelectrónicos. Estas tecnologías aún abarcan metales, cerámicos y polímeros sintéticos, pero también polímeros naturales, sistemas autoensamblados, nanopartículas y marcadores cuánticos. La función de un biomaterial debe ser la de dirigir el curso de un tratamiento médico, sea de diagnóstico o terapia, y debe hacerlo controlando específicamente las interacciones con los componentes biológicos del paciente a ser tratado.

Muy recientemente en 2009, teniendo en cuenta éstas y otras consideraciones, el término biomaterial se ha redefinido como *una sustancia diseñada para tomar una forma en la que, sola o como parte de un sistema complejo, se emplea para dirigir, mediante el control de las interacciones con los componentes de sistemas vivos, el curso de un procedimiento terapéutico o de diagnóstico, en medicina humana o veterinaria* [4].

1.2 Ingeniería de Tejidos

Anualmente se realizan millones de procedimientos quirúrgicos a nivel mundial que requieren el uso de tejidos u órganos sustitutos para reparar o reemplazar los que sufren de alguna patología o están severamente dañados por cáncer, anomalía congénita o trauma. Entre las aproximaciones tradicionales para la sustitución de tejidos y órganos se encuentran los implantes biológicos (autoinjerto o reconstrucción quirúrgica, aloinjerto o trasplante y xenoinjerto) y los dispositivos biomédicos basados en biomateriales [5-9]:

a) Autoinjerto o autoplastia (*autografting*): extracción de tejidos sanos de un paciente para ser transplantados en otra parte del mismo paciente. El empleo del injerto autólogo es una opción que elimina los factores inmunológicos y la transmisión de diversas enfermedades. Sin embargo, existen varios problemas asociados con esta terapia, como infección, dolor, pérdida de sangre, necesidad de transfusión (con los riesgos inherentes), y la posibilidad de degradación del injerto durante el período de implantación.

b) Aloinjerto u homoplastia (*allografting*): extracción de tejidos u órganos de un donante y su trasplante a un paciente. El donante debe haber fallecido recientemente en el caso de extracción de corazón, riñón, hígado, páncreas o hueso, pero se pueden extraer pulmón y riñón de donantes vivos. Aunque la tecnología de trasplantes ha mejorado notablemente en las últimas décadas con el desarrollo de terapias inmunosupresivas, el problema principal reside en la escasa disponibilidad de donantes y el rechazo inmune.

c) Xenoinjerto (*xenografting*): implante de tejidos de otras especies previamente tratados para reducir las reacciones de antigeneicidad, eventos de trombosis, calcificación, etc. El empleo de pericardio bovino, convenientemente tratado, como válvula cardíaca y la piel porcina liofilizada para la cobertura temporal de quemaduras hasta la realización del autoinjerto, constituyen dos ejemplos del uso de tejidos provenientes de individuos de otra especie.

d) Dispositivos biomédicos basados en biomateriales: la ciencia y tecnología de biomateriales han permitido la obtención de materiales y dispositivos para reemplazar, aumentar o extender diversas funciones realizadas por los sistemas biológicos. Los ejemplos son numerosos: dispositivos de asistencia cardíaca, prótesis de cadera, lentes intraoculares, implantes mamarios, etc. Muchos de estos dispositivos han producido un

enorme beneficio en el aumento de la calidad de vida. Sin embargo, los materiales empleados en estas terapias poseen serias limitaciones, están sujetos a fatiga, fractura, toxicidad, inflamación, desgaste y falta de remodelación con el tiempo (crecimiento, cambio de forma, respuesta, etc.). Además, los dispositivos actuales tampoco se comportan fisiológicamente como tejidos u órganos. Por ejemplo, los dispositivos de asistencia cardíaca se emplean en terapias temporarias hasta la disponibilidad de un órgano donado. Los órganos artificiales han mejorado con los importantes avances en la ingeniería biomédica, pero requieren aún mayor biocompatibilidad y biofuncionalidad. Los biomateriales actuales proporcionan en muchos casos casi exclusivamente una función mecánica, debido a que no tienen componentes metabólicos con los cuales desarrollar funciones tisulares activas.

La ingeniería de tejidos surgió a finales del siglo XX como una aproximación alternativa e interdisciplinaria para sobrellevar las limitaciones de las terapias tradicionales para el tratamiento de falla o reemplazo de órganos, constituyendo éste uno de los principales problemas mundiales en el sistema de salud. La denominación ingeniería de tejidos se propuso en una reunión auspiciada por la National Science Foundation en 1987 [10], donde se definió este campo de investigación y desarrollo como *la aplicación de los principios y métodos de ciencias de la ingeniería y la vida para el conocimiento fundamental de la relación entre estructura-función en tejidos normales y patológicos de mamíferos y el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función de tejidos u órganos* [11]. Una década después, D. F. Williams definió ingeniería de tejidos como *la persuasión del cuerpo para curarse a sí mismo, ayudado por la presencia de células apropiadas, biomoléculas y estructuras de soporte en situaciones donde la evolución ha determinado que el ser humano no tiene más la potencia propia de regeneración* [3]. Recientemente en 2009, el mismo autor redefinió a la ingeniería de tejidos como *la creación (o formación) de un tejido nuevo para la reconstrucción terapéutica del cuerpo humano, por la estimulación deliberada y controlada de determinadas células blanco, a través de una combinación sistemática de señales moleculares y mecánicas* [4]. En esta definición no hay ninguna mención a un biomaterial y se reconoce ampliamente que la ingeniería de tejidos no involucra un material convencional. Si consideramos el paradigma clásico de la ingeniería de tejidos normalmente se emplea un material, en la forma de matriz o andamiaje poroso, para proporcionar una forma al tejido en construcción y para facilitar la liberación de señales moleculares y mecánicas. El concepto de biomaterial abarca al

compuesto formado por la matriz y las células sembradas. Si durante un proceso *ex-vivo* en un biorreactor la matriz se degrada y se reemplaza por el tejido regenerado, el resultado es también un biomaterial.

Las bases de la ingeniería de tejidos son extensas y abarcan un amplio espectro de fundamentos científicos que incluyen diversas disciplinas que se complementan: ciencias químicas, biológicas y médicas (bioquímica, biomecánica, biología celular, inmunología, fisiología, anatomía, etc.), ingenierías (ciencia y tecnología de materiales, mecánica computacional, cinética química y dinámica de fluidos), bio y nanotecnologías (cultivo celular, separación de células y transferencia genética), entre otras.

En los últimos años el desarrollo de diversas disciplinas (principalmente biología molecular y celular, genética e ingeniería de tejidos) condujo a la aparición de un campo nuevo de investigación interdisciplinaria denominado medicina regenerativa. La falta de consenso entre los miembros de la comunidad científica acerca de los alcances y objetivos de este campo creó diversas confusiones. La ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa se emplean muchas veces como sinónimos, aunque algunos autores consideran que la medicina regenerativa va más allá de los objetivos de la ingeniería de tejidos [12]. La medicina regenerativa involucra dos estrategias dependiendo del empleo o no de matrices porosas:

- Empleo de moléculas solubles, terapia génica, terapia con células madre (biología celular sin matrices extracelulares),
- Empleo de matrices extracelulares en ingeniería de tejidos (cirugía regenerativa).

En los últimos veinte años se han desarrollado cuatro aproximaciones principales que emplean diferentes tipo de matrices para la ingeniería de tejidos (**Figura 1.1**).

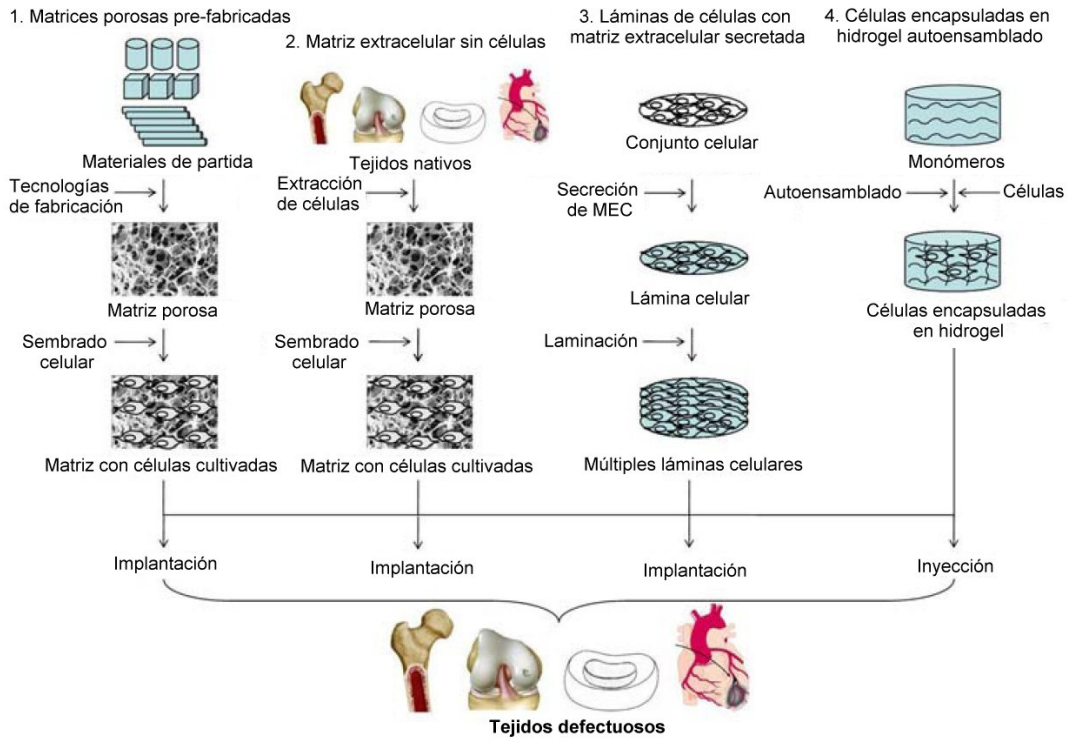


Figura 1.1: Estrategias seguidas con diferentes matrices para ingeniería de tejidos [13].

Desde el nacimiento de la ingeniería de tejidos, el sembrado terapéutico de células en matrices porosas y degradables pre-diseñadas es la principal aproximación. Los mayores esfuerzos se dirigen al diseño y desarrollo de diferentes materiales y tecnologías de fabricación. En esta estrategia, el punto de partida es el diseño de biomateriales con composición química y arquitectura apropiadas para constituir una matriz extracelular artificial o andamiaje (*scaffold*) en la que tienen lugar los procesos celulares de adhesión, diferenciación y crecimiento celular que estructuren espacialmente tejidos. Las funciones que cumple la matriz extracelular en los tejidos nativos y en los tejidos diseñados a partir de matrices sintéticas o naturales son:

- Proporcionar un soporte estructural para que residan las células,
- Contribuir a las propiedades mecánicas de los tejidos,
- Proporcionar estímulos bioactivos para que las células respondan a su microambiente,
- Actuar como reservorios de factores de crecimiento y para potenciar sus acciones,

- Proporcionar un ambiente físico flexible para permitir el remodelamiento de los tejidos en respuesta a los procesos dinámicos.

El origen de las células a emplear en el sembrado constituye el principal problema y tiene una influencia enorme en el éxito de la ingeniería de tejidos. El empleo de células autólogas o células madre (*stem cells*) tiene las ventajas de los autoinjertos, pero con los problemas asociados con la baja disponibilidad en pacientes ancianos o gravemente enfermos. Las células alogénicas o xenogénicas requieren de terapias inmunosupresivas. La incorporación de factores de crecimiento que intervengan en las señales biológicas que regulan las funciones celulares, facilitando y promoviendo la regeneración del tejido otorga mayor especificidad y funcionalidad a la matriz [14]. El tejido desarrollado con la matriz (*tissue-engineered construct*) puede implantarse en el sitio requerido de manera tal que se integre homogéneamente con el tejido natural circundante [15].

Para cumplir las funciones de una matriz en ingeniería de tejidos, ésta debe reunir una serie de requerimientos particulares tales como micro/nanoestructura porosa (porosidad, tamaño, forma y grado de interconexión de poros, espesor y área superficial de pared), morfología y química superficial, velocidad de degradación, estabilidad y resistencia mecánica adecuadas a una aplicación específica. Las matrices tridimensionales porosas que necesitan las células para guiar su crecimiento y regenerar tejidos en las tres dimensiones están aún muy lejos de ser ideales [16]. Como cualquier biomaterial, un sistema polimérico (macromolécula, ensamble de macromoléculas, dispositivo) destinado a servir durante un período limitado de tiempo antes de degradarse y eliminarse del cuerpo, debe cumplir severos criterios relacionados con biocompatibilidad y biofuncionalidad [17]. Un material es biocompatible cuando no provoca ninguna respuesta indeseada, detectada inmunológica o clínicamente, en las células o tejidos, lo que implica que no es tóxico, inmunogénico, carcinogénico ni trombogénico, y cuando posee una calidad química superficial que promueve la fijación y función celular. Los productos de degradación deben ser no tóxicos y eliminarse del organismo a través de rutas metabólicas, con un perfil de degradación tal que permita el ingreso de tejido y su remodelación bajo la influencia de cargas. La necesidad de canales de interconexión que permitan la migración hacia el interior de las células sembradas y la libre difusión de los nutrientes necesarios y metabolitos es un requerimiento esencial.

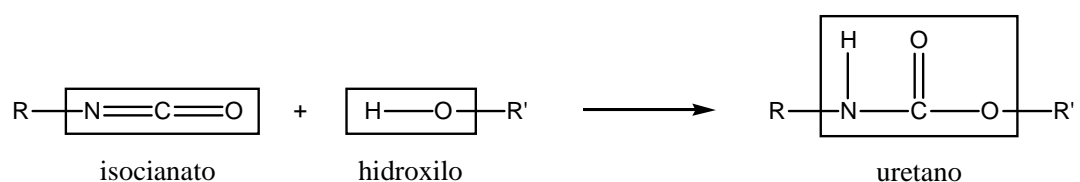
En los últimos años la ingeniería de tejidos ha alcanzado un notable crecimiento y se ha especializado en la búsqueda de mejores alternativas en el tratamiento de muy diversas lesiones, tanto en tejidos como en órganos [18]. El deterioro de los tejidos con la edad conduce a un mayor número de afecciones diferentes, principalmente cardiovasculares y ortopédicas. En resumen, una matriz ideal para ingeniería de tejidos debe cumplir los siguientes requerimientos generales:

- 1) ser biocompatible,
- 2) ser biorreabsorbible o remodelable,
- 3) poseer una cinética de biorreabsorción acorde con el proceso de reparación o regeneración,
- 4) ser altamente porosa con una elevada relación área-volumen y tamaño de poro,
- 5) ser altamente permeable para facilitar la difusión de nutrientes y metabolitos,
- 6) poseer propiedades mecánicas adecuadas para la aplicación específica,
- 7) proporcionar una superficie apropiada para permitir la adhesión celular, promover el crecimiento celular, y mantener las diferentes funciones celulares, ayudando a la formación de la matriz extracelular,
- 8) ser capaz de portar drogas o factores de crecimiento.

Los polímeros sintéticos degradables ofrecen la mayor variedad de opciones, entre estos materiales se encuentran poli(ácido glicólico) (PGA) y poli(ácido láctico) (PLLA o PDLLA), ambos poli(α -hidroxiésteres), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), combinaciones entre estos materiales y sus copolímeros. Los sistemas porosos formados por microesferas aglutinadas de copoliéster 50/50 P(L-LA-co-CL) de alto peso molecular [19,20], las fibras de PGA estabilizadas con PGLA [21], y las fibras de PGA o PGLA sembradas con fibrocondrocitos [22,23] han mostrado propiedades interesantes para estas aplicaciones. En el caso de copolímeros, la velocidad de degradación puede adaptarse a los requerimientos de numerosas aplicaciones mediante la adecuada selección de la estructura química y la composición. Sin embargo, las propiedades mecánicas de los poliésteres alifáticos resultan en muchos casos inadecuadas cuando se necesita cierta elasticidad, rigidez, tenacidad y comportamiento a la fatiga. Los poliuretanos representan una alternativa interesante ya que resultan sumamente versátiles y cubren un amplio intervalo de propiedades.

1.3 Poliuretanos

Los poliuretanos se sintetizaron por primera vez en 1937 y su investigación y desarrollo aumentó notablemente desde la segunda guerra mundial. El término poliuretano se refiere genéricamente a una extensa familia de polímeros que contienen el grupo funcional *uretano* en alguna de sus unidades repetitivas. El grupo uretano puede considerarse como un éster del ácido carbámico o como una éster-amida del ácido carbónico, resultante en general de la reacción de un isocianato y un alcohol (**Esquema 1.1**).



Esquema 1.1: Reacción de formación de un grupo funcional uretano.

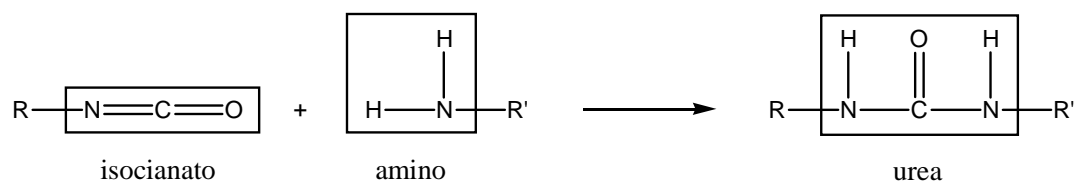
En la síntesis de poliuretanos se emplean principalmente tres monómeros:

- un isocianato (di o polifuncional), aromático o alifático,
- un poliol (di o polifuncional) de cadena larga y flexible que a temperatura ambiente se encuentra por encima de su temperatura de transición vítrea,
- un monómero de cadena corta, denominado extendedor de cadena si es difuncional (diol o diamina), o entrecruzante si su funcionalidad es mayor a 2.

Dependiendo de la funcionalidad, naturaleza y estructura química, reactividad y peso molecular de los componentes, es posible obtener polímeros lineales o entrecruzados, con un amplio rango de estructuras y propiedades, que van desde materiales blandos con características elastoméricas hasta materiales rígidos aptos para aplicaciones estructurales.

Esta versatilidad se amplía aún más al emplear reactivos con grupos funcionales amino para dar lugar a la formación de grupos urea (**Esquema 1.2**). Cuando un macrodiol reacciona con un diisocianato y posteriormente con un extendedor/entrecruzante poliamina se forman poli(uretanoureas), mientras que cuando una macrodiamina reacciona con un diisocianato y posteriormente con un extendedor/entrecruzante poliamina se obtienen poliureas. Por su parte, cuando los diisocianatos reaccionan consigo mismos se obtienen poliisocianuratos. Estos tres tipos

de polímeros se incluyen comúnmente dentro de la denominación genérica de poliuretanos.



Esquema 1.2: Reacción de formación de un grupo funcional urea.

Aunque la reacción de un diisocianato y un diol abarca a la gran mayoría de las síntesis de poliuretanos, es posible sintetizar poliuretanos por otra vía, como por ejemplo mediante la reacción de diaminas con carbonatos cíclicos [24]. El poliuretano obtenido contiene una funcionalidad hidroxilo, lo cual lo hace un intermediario interesante para una gran variedad de aplicaciones.

1.3.1 Poliuretanos segmentados (SPU)

Los SPU son copolímeros en bloque, compuestos por bloques o segmentos blandos que forman dominios blandos (fase viscosa o gomosa), con temperatura de transición vítrea ($T_{g,s}$) por debajo de la temperatura ambiente, y bloques o segmentos duros que forman dominios duros (fase vítrea) con $T_{g,h}$ por encima de la temperatura ambiente. Los segmentos blandos están constituidos por la cadena del macrodiol, mientras que los segmentos duros están formados por una distribución de unidades [diisocianato – extendedor de cadena]_n – diisocianato (**Figura 1.2a**). Los dominios blandos pueden tener una morfología amorfa o semicristalina, dependiendo de la longitud de cadena, geometría y estructura química del macrodiol. Los dominios duros, de la misma manera, puede ser amorfos o semicristalinos. Los SPU se comportan como materiales elastómeros termoplásticos.

Los segmentos blandos (poliéteres, poliésteres, poli(éster-éter-éster), policarbonatos o polisiloxanos, por citar los más estudiados) proporcionan flexibilidad y son generalmente la fase continua, mientras que los segmentos duros (bloques con unidades uretano, urea, amida o anillos bencénicos) actúan como puntos de entrecruzamiento físico reversible por cristalización y/o asociación molecular a través

de interacción por puente de hidrógeno [25,26]. La morfología de los sistemas poliuretánicos es un factor clave en las propiedades finales de los materiales.

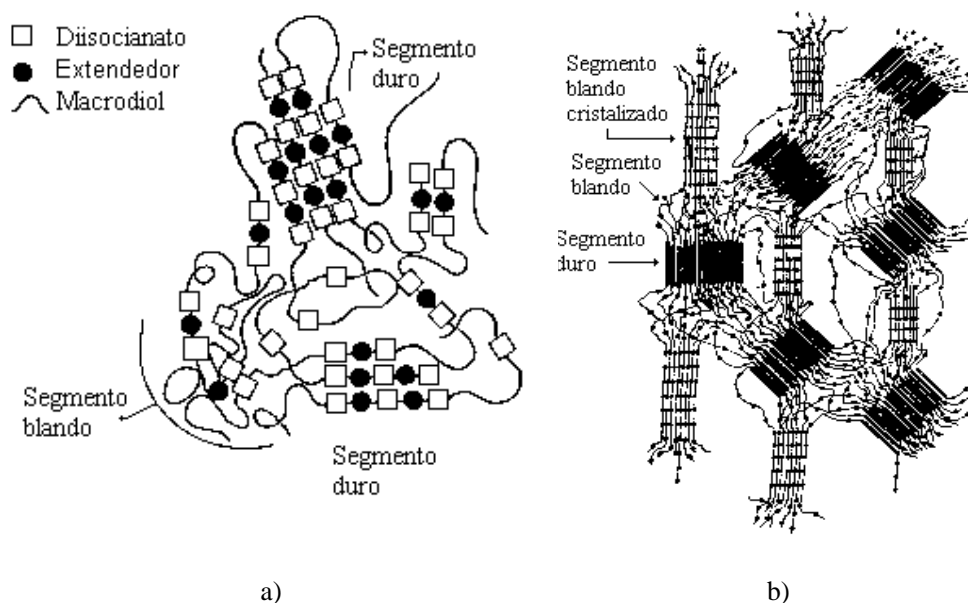


Figura 1.2: Representaciones de un SPU: a) esquema de la microestructura en un SPU [27] y b) formación de dominios semicristalinos separados [28].

La variación de energía libre de mezcla de estos segmentos es positiva ya que el término entálpico es positivo y de mayor magnitud que el término entrópico, el cual también es positivo debido al incremento del desorden del sistema. Por lo tanto, el sistema no se presenta como una fase homogénea sino que existe una fuerza impulsora que lo lleva termodinámicamente a la formación de fases o dominios. Los principales factores que influyen el grado de segregación en microfases de los SPU incluyen:

- 1) Estructura química, peso molecular promedio y distribución de pesos moleculares de los segmentos blandos,
- 2) Estructura química y simetría del diisocianato,
- 3) Estructura química del extendedor de cadena, longitud de cadena promedio y distribución de longitudes de cadena de los segmentos duros, restricciones conformacionales y estéricas,
- 4) Proporción de segmentos blandos y duros en el copolímero,
- 5) Cristalizabilidad de los segmentos blandos y duros,
- 6) Extensión de las interacciones puente de hidrógeno entre segmentos duros y entre segmentos duros y blandos,

- 7) Solubilidad inherente entre segmentos blandos y duros,
- 8) Procedimiento de polimerización usado en la síntesis y el método de procesamiento de muestras,
- 9) Naturaleza de la región interfásial entre los dominios de segmentos blandos y duros.

Variando la relación de segmentos es posible obtener materiales rígidos, donde la matriz está constituida por la fase dura y la fase elastomérica promueve mecanismos de deformación en la matriz que aumentan su tenacidad. Los segmentos duros pueden estar interconectados o aislados, inmersos en una fase gomosa de segmentos blandos. Si la separación de fases es incompleta, los segmentos blandos pueden contener algunos segmentos duros ligados por puente de hidrógeno entre grupos uretano y oxígeno del grupo éter, éster o carbonato del macrodiol.

Los extendedores de cadena alargan el segmento duro y promueven la separación en microfases, en particular cuando la estructura química del diisocianato contribuye en menor medida a este proceso. Los extendedores son capaces de impartir propiedades específicas en el material. Por ejemplo, la incorporación de grupos funcionales urea en el extendedor incrementa las interacciones entre los segmentos duros a través de la formación de enlaces puente de hidrógeno bidentados entre los grupos urea en cadenas adyacentes. Asimismo, un diseño apropiado permite introducir grupos hidrolizables en los segmentos duros. La presencia de grupos aromáticos introduce unidades que aumentan significativamente la rigidez de la cadena principal y contribuye a conformar la estructura secundaria. La atracción de las nubes de electrones π entre anillos aromáticos adyacentes también favorece la formación de dominios duros por atracción entre los segmentos duros [29]. El carácter cooperativo de todas estas interacciones dentro de los dominios duros determina la microestructura, el comportamiento mecánico y las propiedades térmicas [30].

Los grupos funcionales presentes en la estructura de un poliuretano son capaces de interactuar vía puente de hidrógeno. Los grupos N-H actúan como dadores, mientras que los carbonilos de uretano, urea, éster o carbonato, y el oxígeno del éter actúan como aceptores. Aproximadamente el 90 % de los grupos N-H en los segmentos duros se encuentran unidos por puente de hidrógeno a 25 °C, mientras que con el aumento de temperatura, el número de grupos N-H libres se incrementa, indicando una disrupción de estas interacciones [31]. La existencia de enlaces puente de hidrógeno tridimensionales inter-urea tiene un efecto importante en la cohesión de los segmentos y

en las propiedades físicas y mecánicas del poliuretano [32]. La intensidad de las interacciones se relaciona directamente con la energía cohesiva de los grupos funcionales y determina las características de solubilidad para cada par polímero-solvente.

1.3.2 Poliuretanos segmentados en aplicaciones biomédicas

Uno de los primeros aspectos a considerar en el empleo de poliuretanos para dispositivos implantables es su estabilidad molecular *in vivo*. Durante años, los elastómeros de poliuretano se han empleado para dispositivos intra y extracorpóreos en aplicaciones cardiovasculares (dispositivos de asistencia cardíaca, balones para angioplastia e intra-aórticos, prótesis vasculares), catéteres, cánulas, implantes y demás, que requieren materiales con elevada bioestabilidad. La gran versatilidad que presenta el diseño de poliuretanos permite tener un determinado control del comportamiento del material para cumplir su función específica teniendo en cuenta la naturaleza del medio en que debe actuar. En las aplicaciones antes mencionadas, la degradación hidrolítica, oxidativa y enzimática y la calcificación son efectos adversos que limitan seriamente su uso *in vivo*. Los poli(éster uretanos) sufren degradación hidrolítica y no son aceptables para implantes de largo plazo. Los poli(éter uretanos) se emplean tradicionalmente en cirugía cardiovascular, son hidrolíticamente más estables que los poli(éster uretanos) pero están sujetos a degradación oxidativa en varias formas [33]. Desde hace algunos años, la mayor bioestabilidad de los poli(carbonato uretanos) se está aprovechando para extender el tiempo de duración en los casos de aplicaciones permanentes [34,35]. Sin embargo, la bioestabilidad de los poli(carbonato uretanos) está cuestionada, dado que la degradación hidrolítica en su superficie está presente tanto *in vitro* como *in vivo* [36]. Para mejorar su bioestabilidad se incluyen grupos terminales fluorocarbonados que poseen baja energía superficial, alta estabilidad química y buena biocompatibilidad. Estas macromoléculas migran a la superficie y mejoran la bioestabilidad de la superficie modificada [36]. El empleo de grupos terminales o macrodioles poli(dimetil siloxano) tiene la desventaja de la absorción de lípidos y el hinchamiento *in vivo*.

La degradación producida por la inestabilidad química se puede explotar para el diseño de biomateriales para aplicaciones temporarias en las que se busca la eliminación del material una vez implantado en el organismo vivo, como por ejemplo, matrices o soportes tridimensionales para ingeniería de tejidos u otros dispositivos temporarios.

En la literatura aparecen algunos términos tales como biodegradable, biorreabsorbible, bioerosionable y bioabsorbible, que se refieren a procesos diferentes y que se emplean indistintamente sin criterios fundados. Vert y colaboradores [37] han propuesto y discutido ampliamente las siguientes definiciones:

- Biodegradable (*biodegradable*): material polimérico sólido o dispositivo que se descompone debido a degradación macromolecular con dispersión *in vivo* pero sin eliminación del cuerpo (esta definición excluye la degradación ambiental, por hongos o bacterias). El sistema polimérico puede ser atacado por elementos biológicos de tal manera que se generan fragmentos o subproductos de degradación que afectan la integridad del sistema. Estos fragmentos pueden moverse fuera del sitio de acción pero no necesariamente eliminarse del cuerpo.
- Biorreabsorbible (*bioresorbable*): material que experimenta una degradación en masa y además se reabsorbe *in vivo* mediante eliminación por rutas metabólicas: filtración de subproductos de degradación o después de la metabolización. La biorreabsorción implica la eliminación total del material extraño inicial y de los subproductos de degradación (compuestos de bajo peso molecular) sin efectos laterales residuales.
- Bioerosionable (*bioerodible*): material que se degrada en superficie y además se reabsorbe *in vivo*. La bioerosión también implica eliminación total del material.
- Bioabsorbible (*bioabsorbable*): material que puede disolverse lentamente en los fluidos corporales sin ninguna escisión de la cadena polimérica o disminución del peso molecular. Un polímero bioabsorbible puede ser biorreabsorbible si las macromoléculas dispersadas se eliminan completamente.

1.3.2.1 Poliuretanos biorreabsorbibles

Los poliuretanos biorreabsorbibles permiten el desarrollo de matrices adecuadas para una gran variedad de aplicaciones en ingeniería de tejidos, entre las que se encuentran injertos vasculares de diámetro pequeño, piel artificial, prótesis de esófago y tráquea, canales para regeneración de nervios, vectores no virales para terapia génica, parches para reparación de pericardio y miocardio y membranas porosas para el tratamiento de periodontitis. En cirugía ortopédica y traumatología se emplean para la preparación de sustitutos de hueso esponjoso, tejidos para reparación de cartílago articular, materiales inyectables para corrección de defectos óseos, cementos inyectables

para el tratamiento de fracturas compresivas de vértebras con osteoporosis, regeneración de meniscos, y para el reemplazo de núcleos pulposos calcificados en discos intervertebrales en la forma de hidrogeles inyectables.

La selección apropiada de los componentes de la formulación posibilita la preparación de poliuretanos biorreabsorbibles, con un amplio intervalo de propiedades mecánicas, composición, estabilidad química y propiedades superficiales. La mayoría de los polioles disponibles para el uso en poliuretanos biocompatibles y biodegradables son compuestos con grupos hidroxilo terminales entre los que se incluyen: poliéteres, tales como polietilenglicol (PEG o PEO), politetrametilenérglicol (PTMG o PTMO), polipropilénéter glicol (PPO); poliésteres, tales como polibutilenadipato, poliésteres basados en lactonas, como poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y sus copolímeros con L-LA, D,L-LA o GA, y policarbonatos, como poli(1,6-hexanodiol) carbonato. En algunos casos se emplean también poliéteres con grupos amino terminales. El empleo de polioles basados en poliésteres incorpora segmentos hidrolíticamente inestables en la cadena polimérica principal, que pueden degradarse gradualmente con mayor o menor velocidad dependiendo de la composición. Por otra parte, los copolímeros en bloque de PCL con segmentos centrales de poli(óxido de etileno) (PEO) [38,39], o las mezclas PCL/PEO [40-43] permiten controlar la hidrofobicidad/hidrofilicidad de los poli(éster-éter uretanos) y en consecuencia la captación de agua y la degradación.

En la formulación de poliuretanos biorreabsorbibles se evita el uso de isocianatos aromáticos debido a que forman diaminas aromáticas de alta toxicidad como subproductos de la degradación. Las diaminas 2,4-diaminotolueno (TDA) y metilendianilina (MDA) son subproductos de degradación potencialmente carcinogénicos y mutagénicos de los poliuretanos sintetizados a partir de difenilmetanodiisocianato (MDI) y toluendiisocianato (TDI) [44]. Aunque aún no se encuentra disponible comercialmente, el diisocianato de L-lisina (metil- o etil- éster de diisocianato de L-lisina, LDI) ha permitido la síntesis de poliuretanos completamente biorreabsorbibles, formando como subproducto de degradación el aminoácido L-lisina. El LDI puede conseguirse como muestra para estudios de investigación o puede sintetizarse a partir del monohidrocloreuro de L-lisina [45]. Otros isocianatos alifáticos que al degradarse generan diaminas alifáticas de baja toxicidad son diisocianato de isoforona (IPDI), hexametilendiisocianato (HDI), 1,4-butanodiisocianato (BDI) y otros preparados por fosgenación de diaminas, como isocianato de arginina, glutamina e

histidina. El producto de degradación de BDI es 1,4-butanodiamina (putrescina), una diamina no tóxica esencial para el crecimiento y diferenciación celular [46].

Los extendedores de cadena pueden contener enlaces hidrolizables y, de esta manera, incorporarlos en los segmentos duros, aumentando su velocidad de degradación.

Finalmente, la utilización de compuestos polifuncionales conduce a la formación de estructuras entrecruzadas. En la formulación de redes poliuretánicas biorreabsorbibles se emplean polioles de diferente peso molecular y funcionalidad, como glicerol, pentaeritritol, azúcares, poliésteres o copoliésteres tipo estrella normalmente derivados de PCL, PLA, PGA.

1.4 Procesamiento de poliuretanos para la formación de matrices porosas

El aumento notable en la última década del número de publicaciones científicas y patentes relacionadas con matrices para ingeniería de tejidos revela un interés alto y sostenido en el diseño y preparación de matrices porosas [47]. Teniendo en cuenta los requisitos que debe reunir una matriz extracelular artificial, la tecnología para su producción debe controlar tanto la macro como la microestructura. El comportamiento viscoso de los polímeros por encima de su temperatura de transición vítrea o temperatura de fusión y su solubilidad en ciertos solventes orgánicos, da lugar a la existencia de técnicas muy variadas para preparar matrices poliméricas porosas [16,48-50]. No existe una forma universal de obtener matrices para regenerar todos los tejidos. La elección de la técnica más apropiada resulta entonces crítica, y depende de cada material polimérico y la aplicación específica. Se mencionan a continuación algunas de las principales técnicas disponibles [51]:

- Procesado de fibras:
 - Mallas de fibras no tejidas (*non-woven fiber felts or mesh*)
 - Fibras unidas (*fiber bonding*)
- Técnicas de disolución de partículas:
 - Evaporación de solvente y disolución de partículas (*solvent casting - particulate leaching*)
 - Extracción de hidrocarburos porógenos (*hydrocarbon templating*)

- Técnicas de separación de fases:
 - Separación de fases inducida térmicamente (*thermally-induced phase separation, TIPS*)
 - Separación sólido-líquido: liofilización (*freeze-drying*), técnicas combinadas con disolución de partículas (*freeze-drying - particulate leaching*)
 - Inversión de fases y remoción de partículas (*phase inversion - particulate leaching*)
 - Separación de fases inducida por polimerización (*polymerization-induced phase separation*)
- Otras técnicas alternativas:
 - Moldeo en fundido (*melt molding*)
 - Agregación de micropartículas (*microparticle aggregation*)
 - Espumado de compuesto polímero-cerámico (*polymer-ceramic composite foam*)
 - Espumado por gas a alta presión (*high-pressure gas foaming*)
- Técnicas de diseño de arquitecturas tridimensionales por modelado rápido (*rapid prototyping, RP* o *solid free-form, SFF*):
 - Laminación (*sheet lamination, laminate objet manufacturing, LOM*)
 - Impresión tridimensional (*adhesion bonding, 3DP*)
 - Sinterizado por láser (*laser sintering*)
 - Fotopolimerización (*photopolymerization*)
 - Deposición de gotas (*droplet deposition, fused-deposition modelling, FDM*)
- Matrices nanoestructuradas y matrices bioactivas:
 - Matrices nanofibras (*nanofibrous scaffolds*): electrohilado (*electrospinning*)
 - Autoensamblado molecular (*molecular self-assembly*)
 - Separación de fases (*phase separation*)
 - Nanocompuestos porosos (*porous nanocomposite scaffolds*)
 - Andamiajes bioactivos (*bioactive scaffolds*)

Las nanofibras resultan de notable interés debido a la generación de una estructura altamente porosa de elevada relación área/volumen. Las matrices constituidas por nanofibras se pueden obtener con geometrías que permitan rellenar defectos

anatómicos y su arquitectura puede diseñarse para obtener las propiedades mecánicas necesarias para soportar el crecimiento, proliferación, diferenciación y movilidad celular. Asimismo, pueden contener factores de crecimiento, drogas, principios activos y genes para estimular la regeneración de tejidos. Una propiedad inherente de las nanofibras es su alta capacidad de imitar la matriz extracelular de los tejidos y órganos, un complejo compuesto formado por proteínas fibrosas, proteínas solubles y otras moléculas bioactivas que permiten la adhesión y el crecimiento celular. Sin embargo, los estudios de las interacciones célula-nanofibra, la elucidación y el entendimiento completo de la influencia de las nanofibras en las rutas bioquímicas y los mecanismos de las señales que regulan el comportamiento celular requieren de mayor investigación.

Las técnicas mecánicas convencionales permiten obtener fibras con diámetros en el orden del micrómetro. Si bien estos tamaños se utilizan en muchas aplicaciones, existen otras que requieren diámetros de decenas a cientos de nanómetros. El electrohilado (*electrospinning*) es una de las técnicas de procesamiento que presenta mayores ventajas para la producción de nanofibras. Esta tecnología se discutirá en el **Capítulo 8**.

La morfología de las estructuras micro/nanofibrosas obtenidas por electrospinning produce tamaños de poros que son generalmente menores ($< 50 \mu\text{m}$) y más tortuosos que los producidos por otros métodos tales como evaporación de solvente y disolución de partículas y separación de fases inducida térmicamente. Por lo tanto, los métodos de sembrado de altas densidades de células no resultan efectivos para obtener una distribución uniforme en matrices de espesor elevado. Existen diversas aproximaciones para sobrellevar el problema de la microintegración en las que la matriz fibrosa se genera al mismo tiempo que se ubican las células [52].

1.5 Referencias

- [1] Williams D.F. Definitions in biomaterials. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands, **1987**.
- [2] Doherty P., Williams R. L., Williams D.F., Lee A.C. Biomaterials-tissue interfaces. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands, **1992**.
- [3] Williams D.F. The Williams dictionary of biomaterials. Liverpool University Press. Liverpool, UK, **1999**.

- [4] Williams D.F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*, 30 (30): 5897–5909, **2009**.
- [5] Langer R.S., Vacanti J.P. Tissue Engineering. *Science*, 260 (5110): 920–926, **1993**.
- [6] Mooney D.J., Mikos A.G. Growing New Organs. *Sci Am*, 280 (4): 60–65, **1999**.
- [7] Langer R.S., Vacanti J.P. Tissue Engineering: The Challenges Ahead. *Sci Am*, 280 (4): 89–89, **1999**.
- [8] Chapekar M.S. Tissue Engineering: Challenges and Opportunities. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*, 53 (6): 617–620, **2000**.
- [9] Hoerstrup S.P., Lu L., Lysaght M.J., Mikos A.G., Rein D., Schoen F.J., Temenoff J.S., Tessmar J., Vacanti J.P. Tissue Engineering en Biomaterials Science. Segunda Edición (Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E. eds.), Elsevier Academic Press, **2004**.
- [10] Skalak R., Fox C.F. Proceedings of the Tissue Engineering Workshop, Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26–29, **1988**.
- [11] Nerem R.M. Tissue Engineering: The Hope, the Hype, and the Future. *Tissue Eng*, 12 (5): 1143–1150, **2006**.
- [12] Daar A.S., Greenwood H.L. A proposed definition of regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*, 1 (3): 179–184, **2007**.
- [13] Chan B.P., Leong K.W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J*, 17 (Suppl 4): S467–S479, **2008**.
- [14] Deuel T.F., Zhang N. Growth Factors en *Principles of Tissue Engineering*. Segunda Edición (Lanza R.P., Langer R., Vacanti J. eds.), Academic Press, USA, **2000**.
- [15] Moroni L., Elisseeff J.H. Biomaterials engineered for integration. *Mater Today*, 11 (5): 44–51, **2008**.
- [16] Yang S., Leong K.F., Zhaohui D., Chua C.K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng*, 7 (6): 679–689, **2001**.
- [17] Vert M. Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts. *J Mater Sci Mater Med*, 20 (2): 437–446, **2009**.

- [18] Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface*, 3 (10): 589–601, **2006**.
- [19] de Groot J.H., Kuijper H.W., Pennings A.J. A novel method for fabrication of biodegradable scaffolds with high compression moduli. *J Mater Sci Mater Med*, 8 (11): 707–712, **1997**.
- [20] de Groot J.H., Zijlstra F.M., Kuipers H.W., Pennings A.J., Klompmaker J., Veth R.P.H., Jansen H.W.B. Meniscal tissue regeneration in porous 50/50 copoly(L-lactide/ ϵ -caprolactone) implants. *Biomaterials*, 18 (8): 613–622, **1997**.
- [21] Kang S.W., Mi S.S., Sun L.J., Seok L.E., Yong L.K., Guk P.S., Ho P.J., Soo K.B. Regeneration of whole meniscus using meniscal cells and polymer scaffolds in a rabbit total meniscectomy model. *J Biomed Mat Res Part A*, 77A (4): 659–671, **2006**.
- [22] Ibarra C., Jannetta C., Vacanti C.A., Cao Y., Kim T.H., Upton J., Vacanti J.P. Tissue engineered meniscus: a potential new alternative to allogeneic meniscus transplantation. *Transplant Proc*, 29 (1-2): 986–988, **1997**.
- [23] Ibarra C., Koski J.A., Warren R.F. Tissue engineering meniscus: cells and matrix. *Orthop Clin North Am*, 31 (3): 411–418, **2000**.
- [24] Rokicki G. Aliphatic cyclic carbonates and spiroorthocarbonates as monomers. *Prog Polym Sci*, 25, 259–342, **2000**.
- [25] Szycher M. High Performance Biomaterials, (Szycher M. ed.), Technomic, Publ. Inc., Pennsylvania, USA, **1991**.
- [26] Estes G.M., Cooper S.L., Tobolsky A.V. Block polymers and related heterophase elastomers. *J Macromol Sci Revs Macromol Chem*, C4 (2): 313–366, **1970**.
- [27] Camargo R.E., Macosko C.W., Tirrel M., Wellinghoff S.T. Phase separation studies in RIM polyurethanes catalyst and hard segment crystallinity effects. *Polymer*, 26, 1145–1154, **1985**.
- [28] Bonart R. X-Ray Investigations Concerning the Physical Structure of Crosslinking in Segmented Urethane Elastomers. *J Macromol Sci Part B Phys*, 2 (1): 115–138, **1968**.
- [29] Guelcher S.A., Gallagher K.M., Didier J.E., Klinedinst D.B., Doctor J.S., Goldstein A.S., Wilkes G.L., Beckman E.J., Hollinger J.O. Synthesis of biocompatible segmented

polyurethanes from aliphatic diisocyanates and diurea diol chain extenders. *Acta Biomater*, 1 (4): 471–484, **2005**.

[30] Oertel G. Polyurethane handbook, Berlin: Hanser Publishers, p. 34, **1990**.

[31] Seymour R.W., Cooper S.L. Thermal Analysis of Polyurethane Block Copolymers. *Macromolecules*, 6 (1): 48–53, **1973**.

[32] Wang C.B., Cooper S.L. Morphology and properties of segmented polyether polyurethaneureas. *Macromolecules*, 16 (5): 775–786, **1983**.

[33] Wu Y., Sellitti C., Anderson J.M., Hiltner A., Lodoen G.A., Payet C.R. An FTIR-ATR investigation of *in vitro* poly(ether urethane) degradation. *J Appl Polym Sci*, 46 (2): 201–211, **1992**.

[34] Tanzi M.C., Mantovani D., Petrini P., Guidoin R., Laroche G. Chemical stability of polyether urethanes versus polycarbonate urethanes. *J Biomed Mater Res*, 36 (4): 550–559, **1997**.

[35] Chandy T., Hee J.H. Nettekoven W., Johnon J. Long-term *in vitro* assessment of polycarbonate urethane micro catheters: Resistance to oxidation and stress cracking. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, 89B: 314–324, **2009**.

[36] Xie X., Tan H., Li J., Zhong Y. Synthesis and characterization of fluorocarbon Caín end-capped poly(carbonate urethane)s as biomaterials: A novel bilayered surface structure. *J Biomed Mater Res*, 84A: 30–43, **2008**.

[37] Vert M., Li M.S., Spenlehauer G., Guerin P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *J Mater Sci Mat Med*, 3 (6): 432–446, **1992**.

[38] Abraham G.A., Marcos-Fernández A., San Román J. Bioresorbable poly(ester-ether urethane)s from L-lysine diisocyanate and triblock copolymers with different hydrophilic character. *J Biomed Mat Res Part A*, 76A (4): 729–736, **2006**.

[39] Cohn D., Stern T., González M.F., Epstein J. Biodegradable poly(ethylene oxide) /poly(ϵ -caprolactone) multiblock copolymers. *J Biomed Mat Res*, 59 (2): 273–281, **2002**.

[40] Gorna K., Gogolewski S. Novel biodegradable polyurethanes for medical applications, en Synthetic bioabsorbable polymers for implants (Agrawal C.M., Parr

J.E., Lin S.T. eds.), ASTM STP 1396, American Society for Testing and Materials, West Conshohocken (PA), 39–57, **2000**.

[41] Gorna K., Gogolewski S. Biodegradable polyurethanes for implants. II. In vitro degradation and calcification of materials from poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene oxide) diols and various chain extenders. *J Biomed Mat Res*, 60 (4): 592–606, **2002**.

[42] Gorna K., Gogolewski S. *In vitro* degradation of novel medical biodegradable aliphatic polyurethanes based on ϵ -caprolactone and Pluronics with various hydrophilicities. *Polym Deg Stab*, 75 (1): 113–122, **2002**.

[43] Gogolewski S., Gorna K., Turner A.S. Regeneration of bicortical defects in the iliac crest of estrogen-deficient sheep, using new biodegradable polyurethane bone graft substitutes *J Biomed Mat Res Part A*, 77A (4): 802–810, **2006**.

[44] Vermette P., Wang G.B., Santerre J.P., Thibault J., Laroche G. Commercial polyurethanes: The potential influence of auxiliary chemicals on the biodegradation process. *J Biomater Sci Polym Edn*, 10 (7): 729–749, **1999**.

[45] Bruin P., Venstra G.J., Nijenhuis A.J., Pennings A.J. Design and synthesis of biodegradable poly(ester urethane) elastomer networks composed of non-toxic building blocks. *Makromol Chem Rapid Commun*, 9: 589–594, **1988**.

[46] Guan J., Fujimoto K.L., Sacks M.S., Wagner W.R. Preparation and characterization of highly porous biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications. *Biomaterials*, 26 (18): 3961–3971, **2005**.

[47] Hutmacher D.W. Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine (Reis R.L., San Román J. eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA, **2005**.
Capítulo 6.

[48] Karp J.M., Dalton P.D., Shoichet M.S. Scaffolds for Tissue Engineering. *MRS Bulletin*, 28 (4): 301–306, **2003**.

[49] Ma P.X., Elisseeff J. Scaffolding in Tissue Engineering, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, **2005**.

[50] Thomson R.C., Shung A.K., Yaszemski M.J., Mikos A.G. Principles of Tissue Engineering, Segunda Edición, (Lanza R.P., Langer R., Vacanti J. Eds.), Academic Press, USA, **2000**. Capítulo 21.

[51] Abraham G.A., Caracciolo P.C., Buffa F.A., Cuadrado T.R. Diseño y Preparación de Matrices Poliméricas Porosas para Ingeniería de Tejidos Biológicos. Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 59, 115–130, **2007**.

[52] Stankus J.J., Guan J., Fujimoto K., Wagner W.R. Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix. *Biomaterials*, 27 (5): 735–744, **2006**.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS DE LA TESIS

Objetivos y estrategia

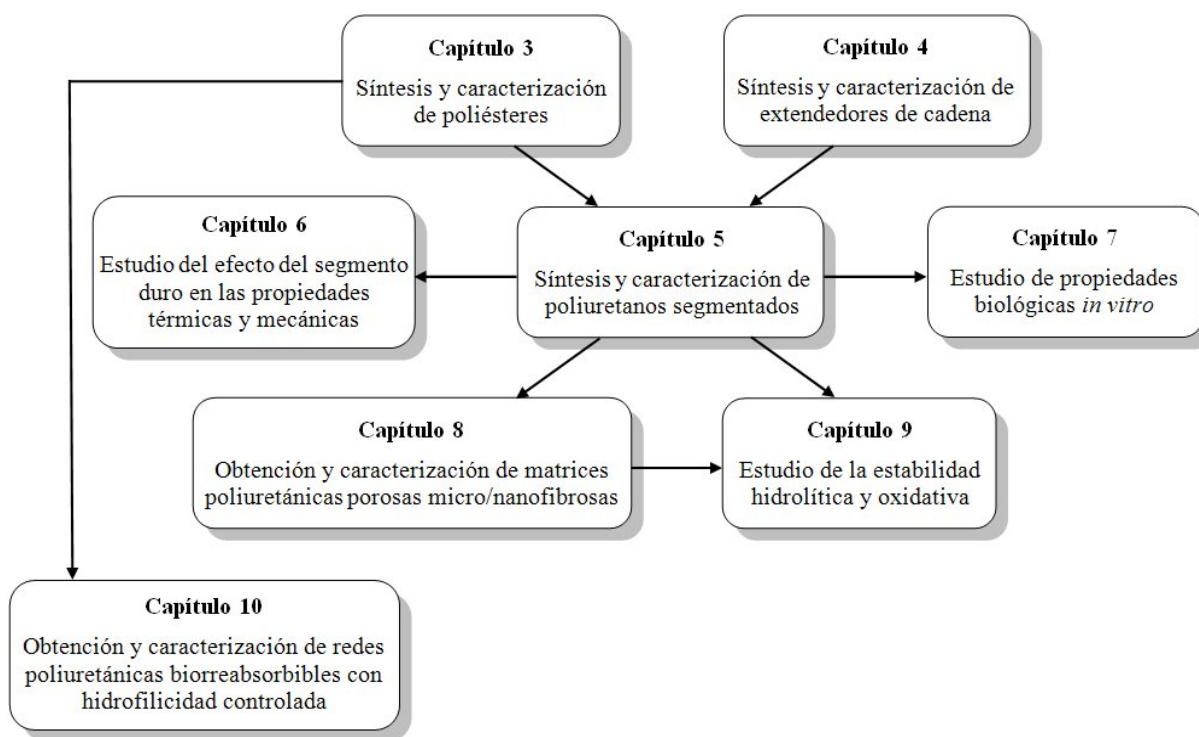
El objetivo general de esta tesis es estudiar una serie de nuevos sistemas poliuretánicos biorreabsorbibles de interés en el campo biomédico, en particular para la preparación de filmes y matrices altamente porosas aplicables en ingeniería de tejidos biológicos.

Para ello, se plantean los siguientes objetivos particulares:

- Sintetizar y caracterizar poliésteres de ϵ -caprolactona con grupos terminales hidroxilo, diferente número de brazos y peso molecular, y baja polidispersidad, para su incorporación en la formulación de poliuretanos, con dominios blandos semicristalinos (**Capítulo 3**).
- Sintetizar y caracterizar nuevos extendedores de cadena difuncionales con grupos hidroxilo terminales y estructuras químicas que permitan: *i*) incrementar las fuerzas de interacción entre cadenas poliuretánicas adyacentes aumentando la cohesión en los dominios duros, y/o *ii*) incorporar grupos funcionales hidrolizables. En el **Capítulo 4** se describe la síntesis de dos extendedores de cadena alifáticos con grupos urea y de un extendedor de cadena aromático con grupos éster.
- Optimizar la síntesis de poliuretanos segmentados biorreabsorbibles para obtener materiales elastoméricos a partir de PCL diol, diisocianatos alifáticos (HDI o LDI) y nuevos extendedores de cadena diseñados para favorecer morfologías de fases separadas (**Capítulo 5**).
- Evaluar el efecto de los diferentes extendedores de cadena y segmentos duros en las propiedades térmicas y mecánicas de los poliuretanos sintetizados (**Capítulo 6**).
- Estudiar las propiedades biológicas *in vitro* de los poliuretanos, a partir de ensayos de adsorción proteica, adhesión y activación plaquetaria, formación de trombos y citotoxicidad, para evaluar algunos aspectos de la biocompatibilidad (**Capítulo 7**).
- Preparar y caracterizar matrices poliuretánicas micro/nanofibrosas mediante la técnica de *electrospinning*, estableciendo los parámetros óptimos de procesamiento para la obtención de membranas con fibras uniformes (**Capítulo 8**).

- Estudiar el comportamiento degradativo de membranas poliuretánicas porosas y no porosas en distintos medios acuosos, a través de ensayos acelerados y en condiciones fisiológicas, examinando la relación existente entre la composición, la morfología y la estabilidad hidrolítica y oxidativa de las mismas (**Capítulo 9**).
- Obtener y caracterizar redes poliuretánicas con hidrofiliidad controlada empleando PCL estrella de diferentes pesos moleculares y número de brazos como componente hidrofóbico, y poli(etilenglicol) (PEG) como componente hidrofílico (**Capítulo 10**).

Esquema de general de la tesis

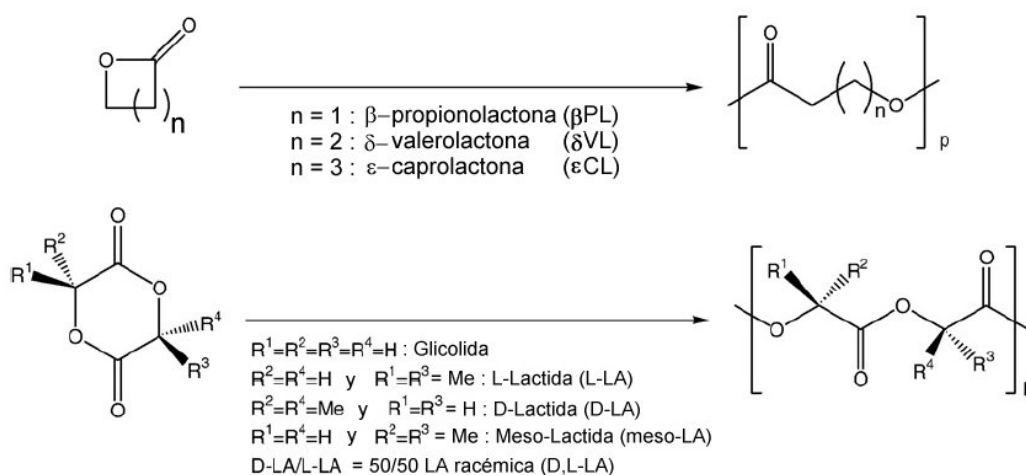


CAPÍTULO 3

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE POLIÉSTERES ALIFÁTICOS CON ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD CONTROLADAS

3.1 Introducción

Los poliésteres alifáticos, junto con los policarbonatos, polianhídridos, poli(β -hidroxialcanoatos), poli(ortoésteres), polifumaratos, polifosfacenos y poli(aminoácidos), son los polímeros sintéticos hidrolizables más conocidos. Entre los poliésteres alifáticos más estudiados se encuentran principalmente homo y copoliésteres al azar, en bloque, injertados, estrella e hiperramificados. Principalmente, los monómeros utilizados en el campo biomédico son lactonas (β -butirolactona, δ -valerolactona, ϵ -caprolactona y dioxanona), lactidas (L-LA y D,L-LA) y glicolida (**Esquema 3.1**).



Esquema 3.1: Polimerización por apertura de anillo de lactonas, lactidas y glicolida.

La síntesis de poliésteres alifáticos con composición química y arquitectura controladas, resulta de alto interés en la preparación de sistemas poliméricos degradables para diversas aplicaciones temporarias, entre las que se incluyen los dispositivos para liberación controlada de fármacos y principios activos y la ingeniería de tejidos [1], así como aplicaciones ecológicas.

La poli(ϵ -caprolactona) (PCL) es un poliéster alifático biodegradable ampliamente investigado por sus interesantes aplicaciones en el campo biomédico y ecológico. La PCL posee un carácter hidrofóbico (debido a la presencia de cinco grupos metileno y un grupo éster relativamente polar), una morfología semicristalina, excelente biocompatibilidad y degradabilidad hidrolítica y enzimática (esta última adquiere relevancia en suelos) a largo plazo, generando subproductos no tóxicos.

La biorreabsorbabilidad de PCL puede explotarse para el diseño de biomateriales para aplicaciones temporarias en las que se busca la degradación o eliminación total del material una vez implantado en el organismo. Por lo tanto, el empleo de PCL en la formulación de poliuretanos permite la obtención de materiales con segmentos biorreabsorbibles. La utilización de poliésteres polioles incorpora en la cadena polimérica principal enlaces que pueden escindirse por hidrólisis gradual con mayor o menor velocidad dependiendo de la composición. Otros poliésteres comúnmente utilizados para la formulación de poliuretanos son los copolímeros de ϵ -caprolactona con lactidas, P(CL-co-LA), P(CL-co-D,L-LA), P(CL-co-GA). Por su parte, los copolímeros en bloque de PCL con segmentos centrales hidrofílicos de poli(óxido de etileno) (PEO) [2,3] o las mezclas PCL/PEO [4-7] permiten controlar la hidrofobicidad/hidrofiliidad de los poli(éster éter uretanos) a partir de la longitud de cadena de los bloques.

Si bien la PCL se encuentra disponible comercialmente con distintos pesos moleculares, el análisis espectroscópico de estos productos reveló la presencia de una mezcla de especies constituida por iniciador no reaccionado e iniciador parcial o totalmente reaccionado. Marcos-Fernández y colaboradores reportaron que PCL diol (Aldrich Chemical Co.) 2000 Da, consiste en una mezcla de 5 % de dietilenglicol (DEG, iniciador), 32 % de DEG monosustituído y 63 % de DEG disustituído [8]. Los porcentajes de iniciador e iniciador monosustituído aumentan en PCL 1250 Da y 530 Da, indicando una importante falta de uniformidad en la longitud de cadena de las especies.

En la síntesis de poliuretanos el uso de macrodioles con alta dispersión de longitudes de cadena tiene una influencia notable en la morfología y separación de fases. Por lo tanto, la necesidad de disponer de polioles hidrolizables con longitud de cadena uniforme, funcionalidad controlada y adecuado peso molecular requiere de una cuidadosa síntesis y caracterización de los productos. La longitud de cadena influye en la cristalinidad del poliéster, mientras que la uniformidad tiene una influencia importante en el grado de separación de fases en los sistemas poliuretánicos, y el conocimiento del peso molecular exacto es importante en la formulación de poliuretanos [9].

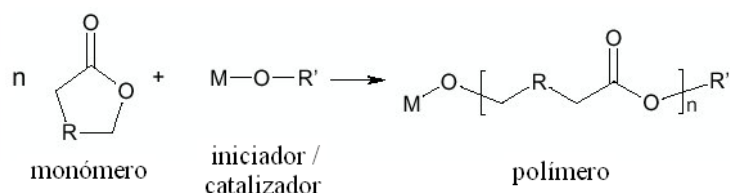
En este capítulo se describe la síntesis y caracterización de poli(ϵ -caprolactona) con grupos terminales hidroxilo y diferente arquitectura (lineal y estrella). Los poliésteres lineales se diseñaron para su empleo como macrodiol en la síntesis de

poli(éster uretanos) lineales (**Capítulo 5**), mientras que los poliésteres estrella se sintetizaron para su utilización en la formulación de redes poliuretánicas, en donde actúan como componente entrecruzante degradable (**Capítulo 10**).

3.1.1 Reacción de polimerización por apertura de anillo (ROP)

Los poliésteres pueden sintetizarse mediante dos métodos distintos: policondensación y polimerización por apertura de anillo. El método de policondensación de una mezcla de dioles y diácidos (o derivados de ácido), o de hidroxiácidos, posee algunas importantes desventajas. Para alcanzar una elevada conversión y peso molecular, este método requiere de condiciones extremas, tales como una elevada temperatura y largos tiempos de reacción, eliminación continua de subproductos de reacción para desplazar el equilibrio (agua) y un balance estequiométrico preciso entre los reactivos.

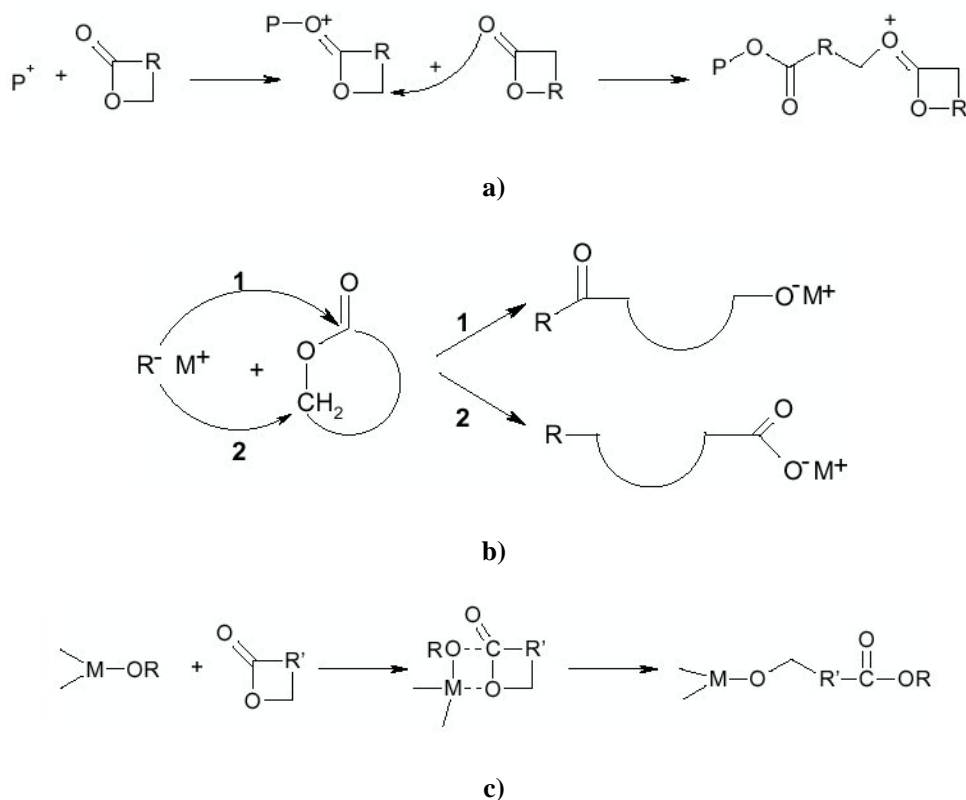
La polimerización por apertura de anillo (ROP) de lactonas (ésteres cíclicos), lactidas y glicolida (diésteres cíclicos) y acetoacetales cíclicos es un método alternativo para producir poliésteres de alto peso molecular y baja polidispersidad, con mayor control del proceso, ya sea en masa, solución, emulsión o dispersión (**Esquema 3.2**). Asimismo, mediante esta vía se pueden obtener copoliésteres bien definidos, incorporar grupos funcionales terminales específicos disponibles para reacciones posteriores a la polimerización, introducir moléculas activas como vitaminas, hormonas y fármacos, o preparar macromonómeros, técnica que ha abierto el campo de la síntesis de copolímeros de injerto con bloques biodegradables [10].



Esquema 3.2: Representación esquemática de la polimerización por apertura de anillo de un éster cíclico, donde R = (CH₂)_{0,3} y/o (CHR'').

Los iniciadores o catalizadores disponibles para este tipo de polimerización son muy variados, incluyendo ácidos protónicos, ácidos de Lewis, hidróxidos alcalinos, compuestos organometálicos que contienen Zn, Sn, Al (como por ejemplo, octoato de

estaño, isopropóxido de aluminio, alcóxidos de metales de transición) y también tierras raras como ytrio y derivados de lantánidos (Sm, Ce, Lu). Dependiendo del iniciador empleado, la ROP puede proceder mediante tres mecanismos principales: polimerización catiónica, aniónica o vía coordinación-inserción [11] (**Esquema 3.3**).



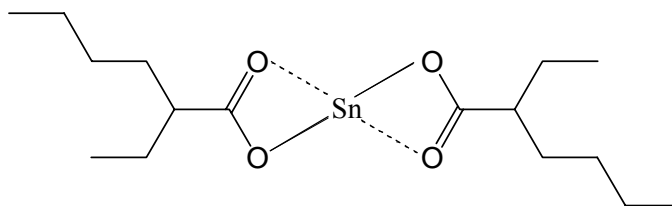
Esquema 3.3: Mecanismos de polimerización por apertura de anillo: a) catiónica, b) aniónica y c) vía coordinación-inserción.

Además, es posible el empleo de otras vías de reacción tales como iniciación radical, zwitteriónica, o mediante compuestos con hidrógenos activos, técnicas que no están muy extendidas. El empleo de condiciones más suaves (bajas temperaturas y tiempos cortos) permite evitar reacciones de transesterificación intra- o intermolecular, la formación de copolímeros en bloque y oligómeros cíclicos que aumentan la polidispersidad.

La polimerización mediante ROP llevada a cabo mediante un mecanismo de coordinación-inserción presenta la ventaja de un mejor control de la estructura de los poliésteres sintetizados, y permite la obtención de mayores pesos moleculares y rendimientos. El empleo de iniciadores mono o difuncionales permite la síntesis de

homo y copoliésteres lineales, mientras que al utilizar iniciadores polifuncionales se obtienen homo y copoliésteres tipo estrella. Los polímeros estrella son moléculas que contienen un punto de ramificación del que emanan cadenas lineales, denominadas brazos. El número de brazos del polímero depende de la funcionalidad del iniciador empleado. A su vez, estos brazos pueden variar o no en su composición y grado de polimerización [12].

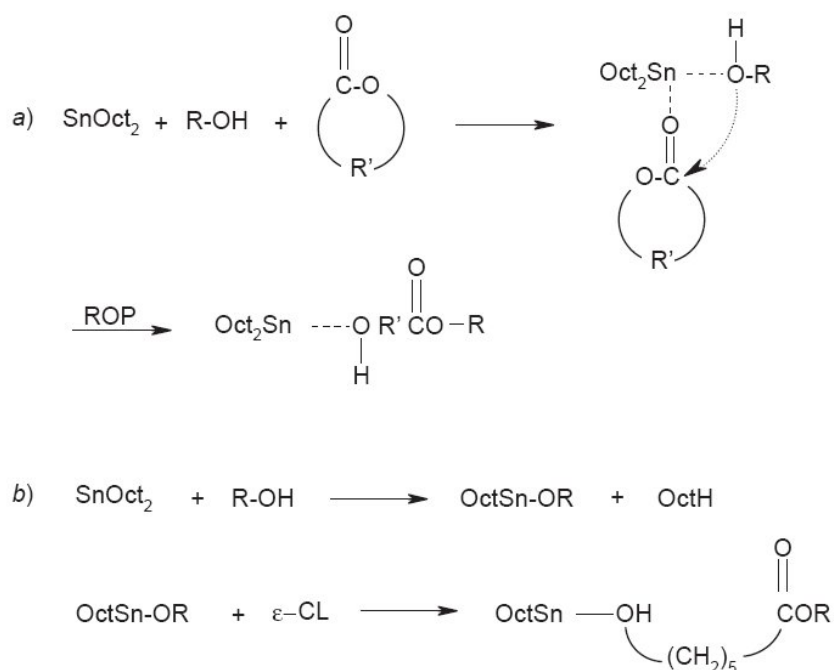
Entre los catalizadores disponibles, el 2-etilhexanoato de estaño – comúnmente conocido como octoato de estaño, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ – (**Esquema 3.4**) se emplea frecuentemente en la ROP de lactonas y lactidas. Este compuesto organometálico presenta alta eficiencia y baja toxicidad, y posee aprobación en EEUU por la American Food and Drug Administration (FDA) como aditivo alimentario.



Esquema 3.4: Estructura química de 2-etilhexanoato de estaño.

El mecanismo de polimerización ha sido ampliamente discutido en la literatura. El $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ no es un iniciador de la reacción dado que el peso molecular no depende de la relación molar [monómero: $\text{Sn}(\text{Oct})_2$]. Los dos mecanismos propuestos difieren ligeramente (**Esquema 3.5**):

- Kricheldorf y colaboradores propusieron un mecanismo donde el alcohol coiniciador y el monómero se coordinan al $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ antes de la propagación [13];
- Penczek y colaboradores presentaron un mecanismo de coordinación-inserción donde el grupo hidroxifuncional coordina al $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ formando un iniciador complejo de alcóxido de estaño antes de la polimerización [14].



Esquema 3.5: Mecanismos principales de ROP propuestos con $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ como catalizador: a) complejación de un monómero y un alcohol antes de ROP de $\varepsilon\text{-CL}$ y b) formación de un alcóxido de estaño antes de ROP de $\varepsilon\text{-CL}$.

De este modo, el alcohol cumple una doble función. Por un lado, permite el control del peso molecular del producto final mediante el ajuste de su relación molar con respecto al monómero. Por el otro, actúa como un coiniador de la reacción de polimerización, controlando el número de brazos de cadenas poliméricas de acuerdo a su funcionalidad.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Materiales

ε -caprolactona ($\varepsilon\text{-CL}$), trietilenglicol (TEG), glicerol, pentaeritritol, 2-etilhexanoato de estaño (octoato de estaño, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$), 1,2-dicloroetano, anhídrido ftálico y piridina se compraron a Aldrich Chemical Co. También se emplearon *N*-metilimidazol (Fluka), anhídrido acético (Mallinckrodt Chemical Inc.), ftalato ácido de potasio (Merk Co.) e hidróxido de potasio (Cicarelli). Los polioles se secaron bajo

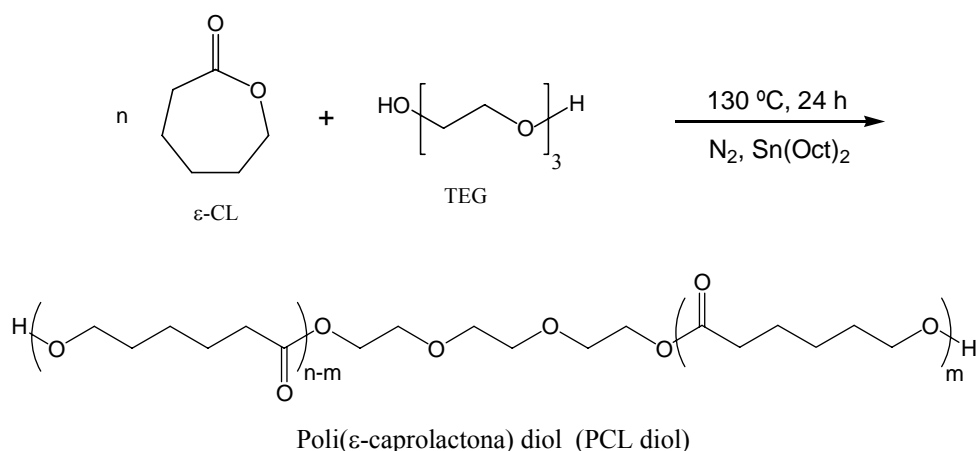
vacío a 60 °C durante 24 horas antes de usar. El resto de los reactivos se utilizó sin previa purificación.

3.2.2 Síntesis de poli(ϵ -caprolactonas)

3.2.2.1 Síntesis de poli(ϵ -caprolactona) diol

La síntesis de poli(ϵ -caprolactona) diol (PCL diol) se efectuó mediante polimerización por apertura de anillo de ϵ -CL iniciada por TEG y catalizada por $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (0,1 % p/p ϵ -CL). Heijkants y colaboradores mostraron que cuando se emplea PCL con peso molecular menor a 1600 Da como segmento blando en la formulación de poliuretanos segmentados se producen dominios blandos completamente amorfos [9]. Por lo tanto, se empleó una relación estequiométrica [ϵ -CL:TEG] [16:1], para sintetizar un poliéster lineal de peso molecular teórico (M_n) de aproximadamente 2000 Da, que permitiría obtener poliuretanos con dominios blandos semicristalinos.

La reacción se llevó a cabo en un balón de dos bocas, en baño de aceite de siliconas a 130 °C con agitación magnética, reflujo y burbujeo de nitrógeno durante 24 horas (**Esquema 3.6**). El producto se dejó enfriar y se disolvió en cloroformo, se precipitó sobre hexano con agitación continua en baño de hielo y se aisló por filtración. Finalmente se secó bajo vacío a temperatura ambiente hasta peso constante.

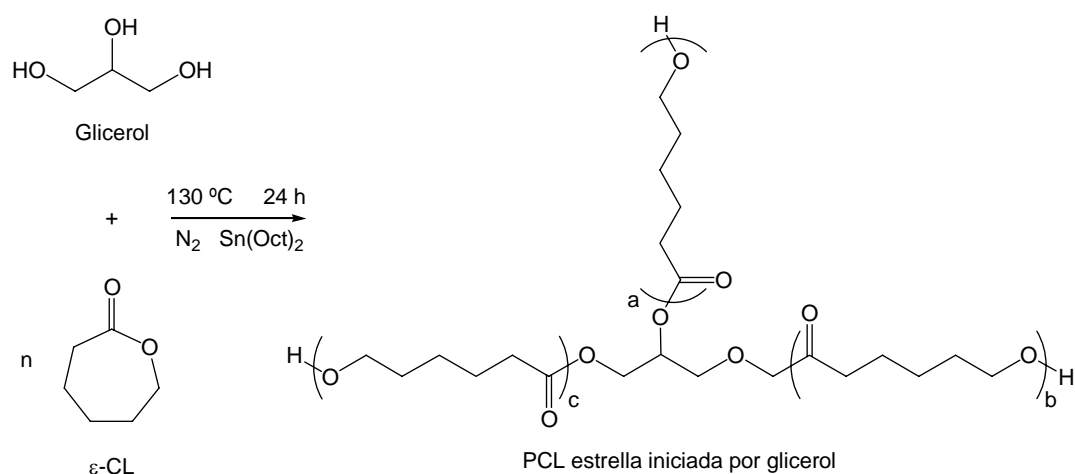


Esquema 3.6: Síntesis de PCL diol partir de ϵ -CL y TEG.

3.2.2.2 Síntesis de poli(ϵ -caprolactonas) estrella

La síntesis de PCL con distinta longitud de cadena y funcionalidad mayor que dos se efectuó de la siguiente manera:

Síntesis de poli(ϵ -caprolactona) con tres brazos: El monómero (ϵ -CL), glicerol (iniciador de funcionalidad teórica de tres grupos hidroxilo por mol) y el catalizador (0,1 % p/p ϵ -CL) se colocaron en un balón de dos bocas. Se emplearon las relaciones estequiométricas [ϵ -CL:OH]: [2:1], [3:1] y [8:1]. La reacción de polimerización se llevó a cabo a 130 °C con agitación magnética, reflujo y burbujeo de nitrógeno durante 24 horas (**Esquema 3.7**).

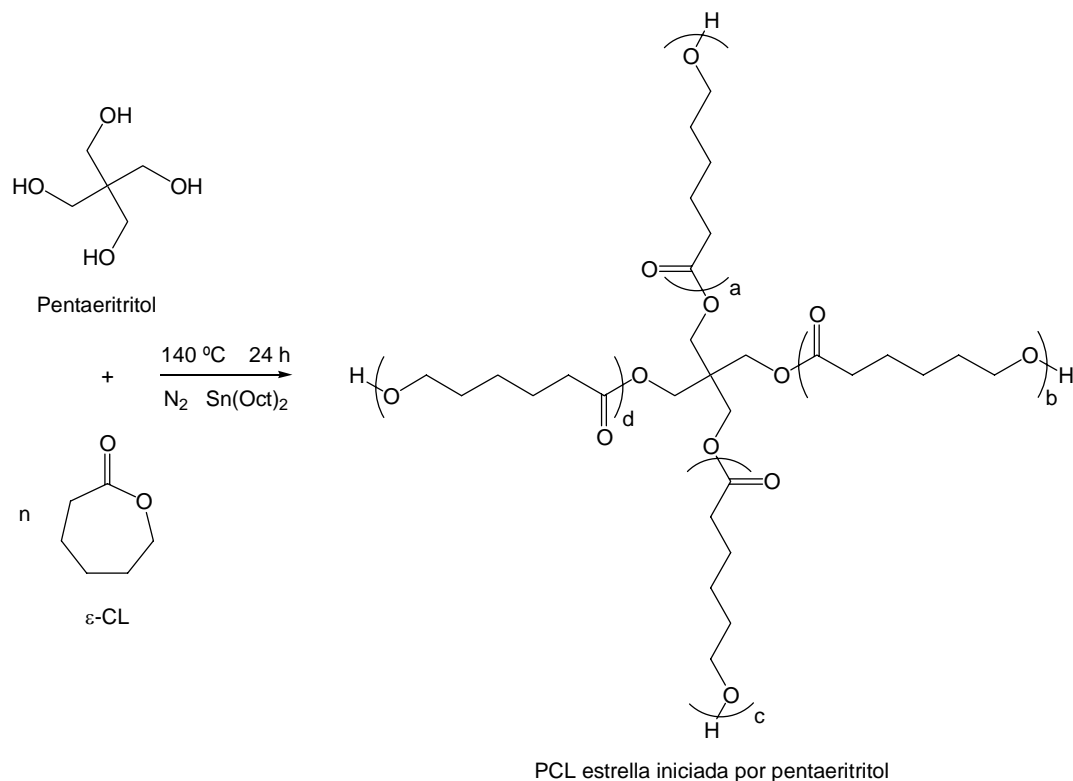


Esquema 3.7: Polimerización de ϵ -CL iniciada por glicerol.

El producto se dejó enfriar y se disolvió en cloroformo, se precipitó sobre hexano con agitación continua en baño de hielo y se aisló por filtración. Finalmente se secó bajo vacío a temperatura ambiente hasta peso constante.

Síntesis de poli(ϵ -caprolactona) con cuatro brazos: El monómero (ϵ -CL) y el pentaeritritol (iniciador de funcionalidad teórica de cuatro grupos hidroxilo por mol) se colocaron en una ampolla de vacío. Se emplearon las relaciones estequiométricas [ϵ -CL:OH]: [8:1], [15:1] y [30:1]. Dado que el pentaeritritol no es soluble en ϵ -CL, la mezcla de reacción se homogeneizó mediante sonicación. Posteriormente se agregó el catalizador (0,1 % p/p ϵ -CL), se solidificó con mezcla frigorífica de acetona/hielo seco y se evacuó la ampolla bajo vacío.

La mezcla de reacción en estado líquido a temperatura ambiente se calentó a 140 °C durante 24 horas con agitación magnética (**Esquema 3.8**). El producto se dejó enfriar y se disolvió en diclorometano, se precipitó sobre metanol con agitación continua en baño de hielo y se aisló por filtración. Finalmente se secó bajo vacío a temperatura ambiente hasta peso constante.



Esquema 3.8: Polimerización de ϵ -CL iniciada por pentaeritritol.

3.2.3 Métodos de caracterización

Se emplearon las siguientes técnicas de caracterización fisicoquímica para los reactivos, monómeros y polímeros sintetizados:

3.2.3.1 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H NMR)

Los estudios mediante NMR permitieron elucidar la estructura química de los polímeros sintetizados (funcionalidad efectiva de los alcoholes iniciadores, composición en términos de número de brazos y longitud promedio de cadena), así como también determinar sus valores de peso molecular promedio en número (M_n).

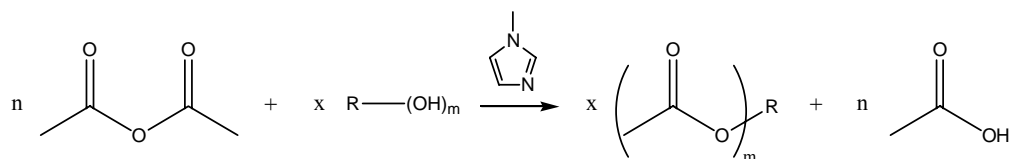
Las determinaciones se efectuaron con un espectrómetro de NMR Bruker AM-500 de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (UBA) y espectrómetros Bruker 300, Varian 400 y 500 del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros del CSIC, Madrid, España. En todos los casos se utilizó como solvente cloroformo deuterado (CDCl_3).

3.2.3.2 Cromatografía de exclusión de tamaños (SEC)

Los análisis mediante SEC permitieron determinar la distribución de pesos moleculares y valores promedio M_n y M_w . El índice de polidispersidad se calculó como M_w/M_n . Los ensayos se llevaron a cabo en Cromatógrafo Waters 244 empleando: solvente: CHCl_3 , velocidad de flujo: $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, volumen inyectado: $50 \mu\text{l}$, columnas: Waters Ultrastyrigel 10^4 \AA (5000 - 600000) – Waters Ultrastyrigel 10^3 \AA (200 - 30000) – Waters Styragel HR-1 100 \AA (10 - 5000). Calibración: estándares de poliestireno de $M_{\text{pico}} = 785, 1460, 1950, 5000, 9075$ y 34100 .

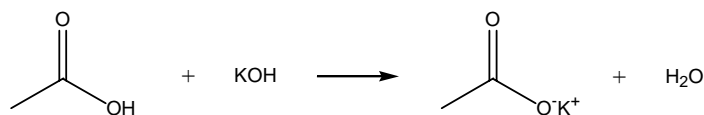
3.2.3.3 Determinación de M_n por titulación de grupos hidroxilo terminales

a) Acetilación con anhídrido acético [15]: Los grupos hidroxilo terminales de los poliésteres se acetilaron con anhídrido acético (**Esquema 3.9**), empleando 1,2-dicloroetano como solvente, *N*-metilimidazol como catalizador y burbujeo de nitrógeno a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos.



Esquema 3.9: Esterificación de hidroxilos terminales con anhídrido acético.

El exceso de anhídrido acético no reaccionado se hidrolizó mediante el agregado de H_2O a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 minutos. El ácido acético producido se tituló con solución estándar de KOH $0,5 \text{ N}$ (**Esquema 3.10**). La titulación se siguió potenciométricamente y el punto final se determinó a partir de la derivada segunda del potencial con respecto al volumen de titulante.



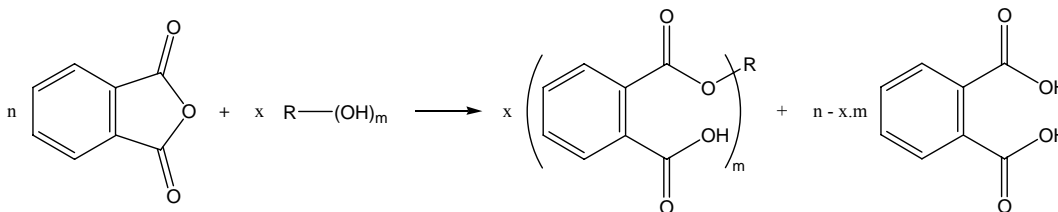
Esquema 3.10: Titulación del exceso de anhídrido acético hidrolizado.

A partir de los resultados obtenidos, los valores de Mn de los poliésteres se calcularon de la siguiente manera:

$$N_{OH} = \frac{(B - A) \cdot 56,11 \cdot N}{W(g)} \qquad Mn = \frac{neq \cdot 56,11 \cdot 1000}{N_{OH}}$$

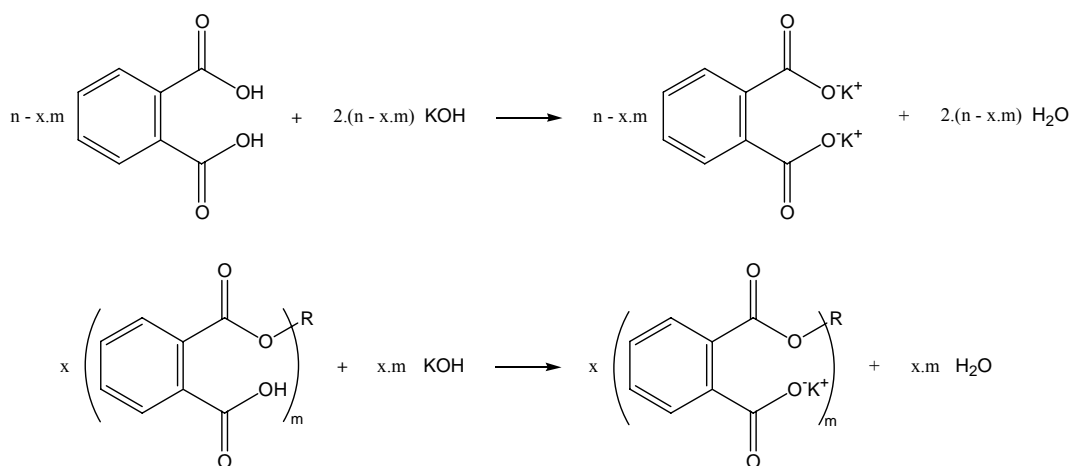
donde: *B* y *A* son los volúmenes de solución de KOH empleados para titular el blanco y la muestra, respectivamente; *N* es la normalidad de la solución de KOH empleada; *W* es la masa (en gramos) de polímero empleada en la determinación; *N_{OH}* es el número de hidroxilos del polímero; *neq* es el número de equivalentes teórico por mol de polímero. Las determinaciones se efectuaron por triplicado.

b) Norma ASTM D 4274-99 [16]. Se empleó el método B (botella a presión con anhídrido ftálico) recomendado para poliéteres y poliésteres, donde los grupos hidroxilo se esterificaron con una solución de anhídrido ftálico (**Esquema 3.11**) en piridina en una botella a presión a 98 °C durante 2 horas.



Esquema 3.11: Esterificación de hidroxilos terminales con anhídrido ftálico.

El exceso de reactivo hidrolizado se tituló con solución estándar de KOH 0,5 N (**Esquema 3.12**). El punto final de la titulación se determinó potenciométricamente.



Esquema 3.12: Titulación del exceso de anhídrido ftálico hidrolizado.

Los valores de M_n de los poliésteres se calcularon del mismo modo que en el caso de la acetilación con anhídrido acético.

3.2.3.4 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El análisis efectuado mediante DSC permitió determinar las propiedades térmicas de los productos sintetizados, tales como temperatura de transición vítrea (T_g), temperatura y entalpía de fusión (T_m y ΔH_m , respectivamente) y porcentaje de cristalinidad (X_c). Los ensayos se llevaron a cabo en los calorímetros Perkin-Elmer Pyris 1 (desde temperatura ambiente) y Shimadzu DSC-50 (desde -120°C) empleando purga de nitrógeno y velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. La T_g se midió en el inicio de la transición (*onset*). X_c se calculó mediante la relación:

$$X_c (\%) = \frac{\Delta H_m \text{ experimental}}{\Delta H_m \text{ teórico}} \cdot 100$$

donde se tomó como valor de ΔH_m teórico el de la entalpía de fusión para PCL 100% cristalina ($148,05 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) [17].

3.2.3.5 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)

Se empleó un espectrómetro FTIR Mattson Genesis II. Los espectros de las muestras, preparadas en forma de discos empleando KBr, se obtuvieron a temperatura

ambiente realizando 64 barridos con una resolución de 2 cm^{-1} . Los análisis efectuados permitieron la identificación de grupos funcionales presentes en los polímeros sintetizados.

3.3 Resultados y Discusión

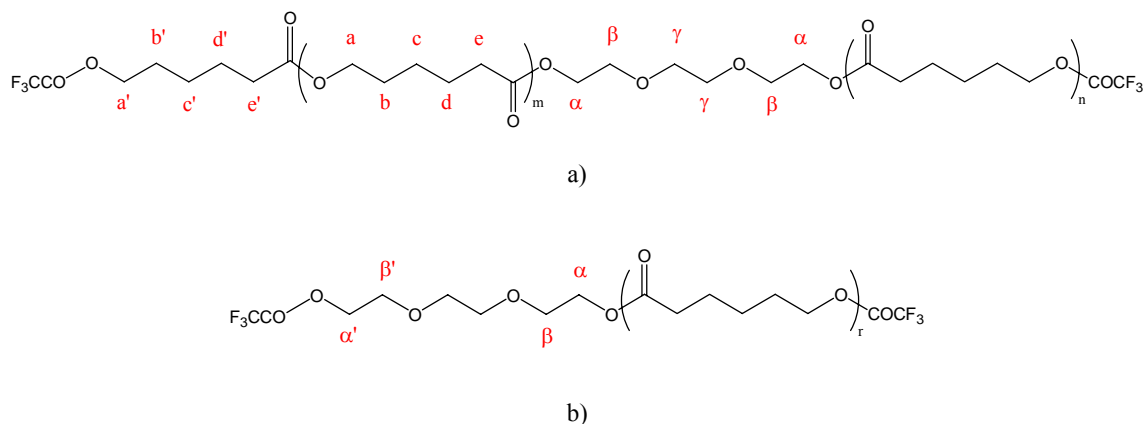
3.3.1 Caracterización de poli(ϵ -caprolactona) diol

El proceso de obtención de poliuretanos lineales con elevado peso molecular requiere de una relación equimolar de grupos funcionales. Por este motivo, es fundamental la determinación precisa del peso molecular y la funcionalidad de los monómeros [7], en particular del macrodiol sintetizado, aspecto que se tratará en las secciones siguientes. Si bien la funcionalidad del diisocianato no se determina directamente, sí se determina la relación $[\text{NCO}:\text{OH}]$ que conduce a mayor peso molecular del poliuretano.

3.3.1.1 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H NMR)

El análisis por espectroscopía de ^1H NMR aportó considerable información estructural de la PCL diol sintetizada. El ensayo se llevó a cabo disolviendo una alícuota de la muestra en cloroformo deuterado, y esterificando los grupos hidroxilo terminales con anhídrido trifluoroacético.

Debido a la presencia de dos grupos hidroxilo por molécula de TEG, es posible que uno o los dos grupos actuaran como iniciadores, reaccionando con ϵ -CL para formar brazos de PCL. De este modo, existen diferentes especies presentes en la síntesis de PCL realizada. Los hidrógenos de grupos metileno de caprolactona adyacentes a grupos hidroxilo terminales esterificados con anhídrido trifluoroacético se indican como α' ; los hidrógenos de grupos metileno de caprolactona adyacentes a grupos éster de la unidad repetitiva se nombran como α ; los hidrógenos de grupos metileno de trietilenglicol adyacentes a grupos hidroxilo esterificados con ϵ -caprolactona se indican como α ; y los hidrógenos de grupos metileno de trietilenglicol adyacentes a grupos hidroxilo terminales esterificados con anhídrido trifluoroacético corresponden a los α' (Esquema 3.13).



Esquema 3.13: Estructuras químicas de TEG a) disustituido y b) monosustituido con PCL, esterificado con anhídrido trifluoroacético en ambos casos, mostrando las asignaciones del espectro $^1\text{H NMR}$.

De este modo, las señales de los hidrógenos $\mathbf{a'}$ se separan de las de los hidrógenos \mathbf{a} , y las señales de los hidrógenos $\mathbf{\alpha'}$ se separan de las de los hidrógenos $\mathbf{\alpha}$ en el espectro de $^1\text{H NMR}$, permitiendo la cuantificación del número de brazos de caprolactona, unidades de caprolactona por cadena y M_n de PCL diol. Aplicando la siguiente ecuación se pudo determinar el porcentaje de especies disustituidas (PCL_2):

$$PCL_2 (\%) = \frac{\alpha}{\alpha + \alpha'} \cdot 100 = 90,42$$

Este resultado indicó que los oligómeros de PCL diol están constituidos por dos especies: un 90,42 % de iniciador se encuentra disustituido (PCL_2) y un 9,58 % monosustituido (PCL_1). Por su parte, no se encontró TEG libre. A partir de este resultado se calculó la funcionalidad efectiva (f_e) del trietilenglicol:

$$f_e = 2 \cdot 0,9042 + 1 \cdot 0,0958 = 1,90$$

El porcentaje de grupos hidroxilo reaccionados con $\epsilon\text{-CL}$ se determinó de la siguiente manera:

$$\text{OH reaccionados } (\%) = \frac{2 \cdot PCL_2 + 1 \cdot PCL_1}{2} = 95,21$$

Luego se calculó la longitud promedio de cadenas de PCL (L_n) como:

$$Ln = \frac{a + a'}{a'} = 10,78$$

Finalmente, se obtuvo el valor de peso molecular promedio en número (Mn_{NMR}) para la PCL diol sintetizada:

$$Mn_{NMR} (\text{Da}) = 150,17 + 1,9 \cdot 10,78 \cdot 114,15 = 2488,19$$

En la **Figura 3.1** se muestra el espectro de ^1H NMR para PCL diol esterificada con anhídrido trifluoroacético y la correspondiente asignación de señales.

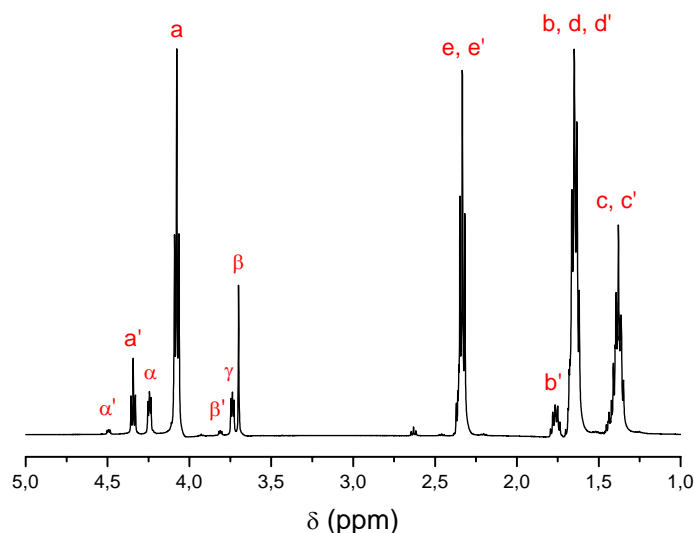


Figura 3.1: Espectro ^1H NMR de PCL diol.

En la **Tabla 3.1** se resumen los resultados obtenidos por espectroscopía de ^1H NMR para PCL diol.

Tabla 3.1: Resultados obtenidos mediante ^1H NMR para PCL diol iniciada por TEG.

Reactivos	Relación [ϵ -CL : OH]	f_i^a	f_e^b	OH reaccionados (%)	Especies de TEG (%)			Ln^c	Mn_i^d (Da)	Mn_{NMR} (Da)
					Libre	Mono- sust.	Di- sust.			
TEG + ϵ -CL	8 : 1	2	1,9	95,21	0	9,58	90,42	10,8	1977	2490

^a Funcionalidad teórica según número de hidroxilos del iniciador.

^b Funcionalidad efectiva del iniciador determinada por ^1H NMR (comparando las integraciones de α' y α , a 4,5 y 4,25 ppm, respectivamente).

^c Longitud promedio de cadenas de PCL determinada por ^1H NMR (comparando las integraciones de a' y a , a 4,35 y 4,10 ppm, respectivamente).

^d Mn teórico calculado de acuerdo a la relación [ϵ -CL:OH].

Los resultados obtenidos muestran la ausencia de TEG en el producto final, así como un elevado grado de sustitución del iniciador, con más de un 90 % de especies disustituidas. De este modo, la longitud promedio de cadenas de PCL supera ligeramente al valor teórico de 8 unidades, debido a la presencia de especies monosustituidas de PCL-TEG.

Estos resultados, si bien normalmente no se informan en literatura, resultan de significativa importancia ya que son indicadores de la uniformidad de los bloques de poliéster a emplear en la síntesis de poliuretanos.

3.3.1.2 Cromatografía de exclusión de tamaños (SEC)

La cromatografía SEC determinó que la PCL diol presenta un índice de polidispersidad de 1,21 ($M_n = 2650$ y $M_w = 3200$). Esta baja polidispersidad indica que existe una estrecha distribución de longitudes de cadena, lo que favorece la síntesis de poliuretanos segmentados con mejor separación de microfases.

3.3.1.3 Determinación de M_n por titulación de grupos hidroxilo terminales

Un problema observado durante las titulaciones con anhídrido acético fue la permanencia de dos fases inmiscibles. Esta falta de homogeneidad podría introducir un error en las determinaciones. Por lo tanto, se emplearon diferentes solventes (cloruro de metileno, cloroformo, 1,2-dicloroetano) con el objeto de determinar la influencia del solvente utilizado. También se varió el tiempo de acetilación e hidrólisis y se observó si la presencia del polímero en la solución afecta el medio de la titulación. A pesar de los cambios efectuados en ningún caso se obtuvieron mejores resultados. Para dilucidar si la presencia de dos fases altera o no la medición se utilizó como método alternativo la titulación con anhídrido ftálico.

El empleo de la técnica recomendada por la norma ASTM: D 4274-99 mostró algunas ventajas con respecto a la anterior dado que resultó más fácil de implementar, las titulaciones se llevaron a cabo en una única fase y con mayor rapidez, y los puntos finales se determinaron de una manera más precisa. Se obtuvo un valor de $M_n = 2250$ Da para PCL diol, que resultó el más próximo al valor teórico.

3.3.1.4 Análisis térmico por Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En el análisis por DSC se observó un cambio de pendiente a $-69,3\text{ °C}$ asignado a la T_g de PCL diol, y un pico endotérmico que presenta un máximo en $50,5\text{ °C}$ ($\Delta H_m = 96,9\text{ J.g}^{-1}$), asignado a la fusión de la fase cristalina (**Figura 3.2**), correspondiente a un X_c de $65,5\%$.

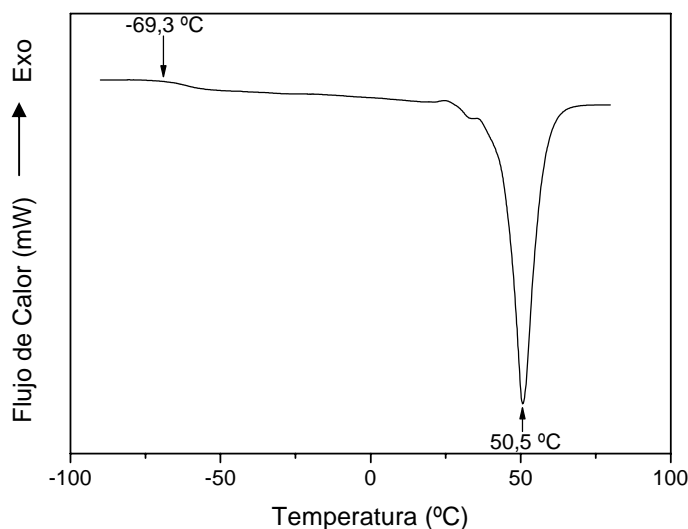


Figura 3.2: Termograma de PCL diol.

En la **Tabla 3.2** se resumen los resultados obtenidos por diversas técnicas para la caracterización de la PCL diol sintetizada:

Tabla 3.2: Datos de la caracterización de PCL diol.

Relación [ϵ -CL : OH]	Mn_t^a	Mn_{tit}^b	Mn_{NMR}	SEC			DSC		
				Mn	Mw	$P.I.$	T_g (°C)	T_m (°C)	X_c (%)
8 : 1	1977	2250	2490	2650	3200	1,21	-69,3	50,5	65,5

^a Mn teórico calculado de acuerdo a la relación [ϵ -CL:OH].

^b Titulación por el método de anhídrido ftálico.

3.3.1.5 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)

El espectro de infrarrojo de PCL diol mostró las típicas señales de un poliéster alifático (**Figura 3.3**). Algunas de ellas son: 3535 cm^{-1} (ν O-H), 2945 cm^{-1} y 2866 cm^{-1}

($\nu_a\text{C-H}$ y $\nu_s\text{C-H}$ en CH_2 , respectivamente), 1723 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$ en éster), 1471 cm^{-1} , 1419 cm^{-1} , 1398 cm^{-1} y 1368 cm^{-1} ($\delta\text{C-H}$ en CH_2), 1246 cm^{-1} y 1194 cm^{-1} ($\nu\text{C-O-C}$ en éster) y 1108 cm^{-1} ($\nu\text{C-O-C}$ en éter).

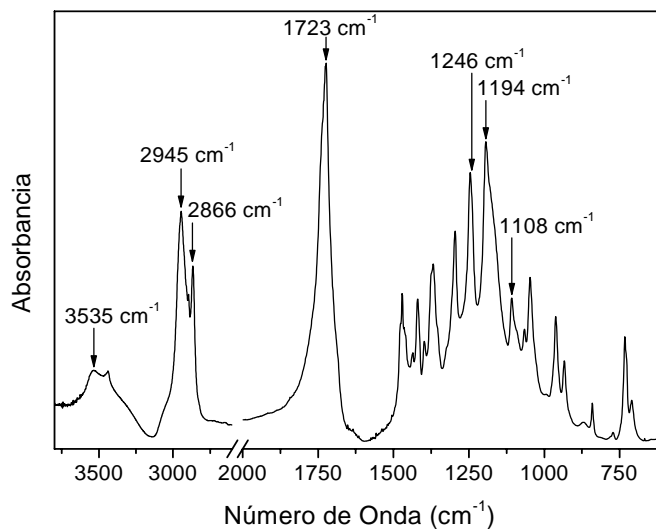


Figura 3.3: Espectro infrarrojo de PCL diol.

3.3.2 Caracterización de poliésteres estrella

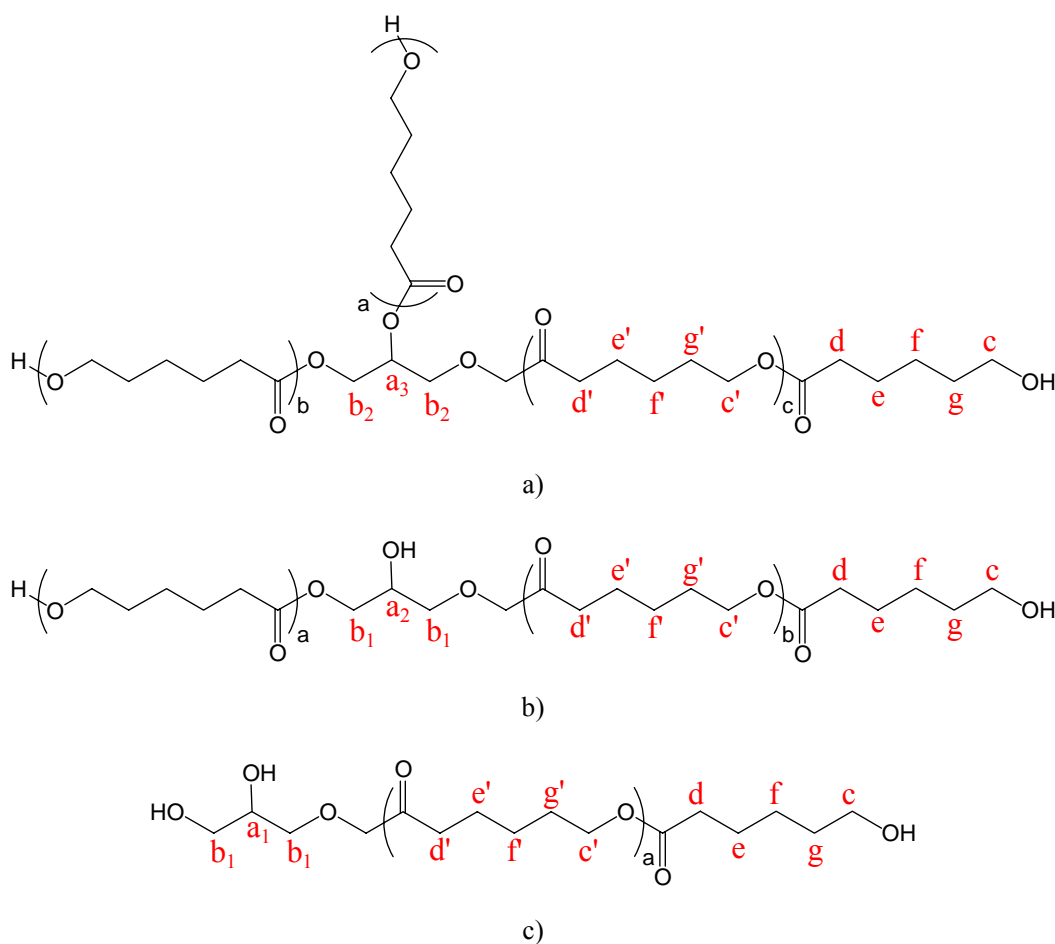
3.3.2.1 Caracterización de poli(ϵ -caprolactona) de tres brazos

3.3.2.1.1 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H NMR)

El análisis mediante espectroscopía de ^1H NMR aportó considerable información estructural de las PCL estrella sintetizadas [18]. La presencia de tres grupos hidroxilo por molécula de glicerol permite la iniciación de la polimerización por apertura de anillo de $\epsilon\text{-CL}$ a partir de uno, dos o los tres grupos. La existencia de especies de PCL con uno y dos brazos se puede explicar por el impedimento estérico producido por las cadenas en crecimiento adyacentes a grupos hidroxilo de glicerol. Como resultado de la menor funcionalidad efectiva del iniciador coexisten diferentes especies producto de las reacciones.

Algunos estudios previos [18] mostraron que a baja relación molar ($[\epsilon\text{-CL}:\text{OH}]$ de [5:1]) se observan en el espectro de ^1H NMR tres señales asignadas a los hidrógenos de grupos metino de glicerol. Al aumentar esta relación, disminuye hasta su

desaparición la señal de menor desplazamiento químico (δ), y luego la señal central, permaneciendo sólo la señal de mayor δ a elevadas relaciones molares. Esto indica que a baja relación $[\epsilon\text{-CL:OH}]$ existen especies de uno, dos y tres brazos de PCL, y a medida que la relación aumenta, se obtienen porcentajes menores (o nulos) de la especie de un brazo, y luego de la especie de dos brazos, obteniéndose sólo la especie de tres brazos a elevadas relaciones molares ($[\epsilon\text{-CL:OH}]$ de [40:1]) [18]. De este modo, las tres señales asignadas a los protones de grupos metino de glicerol se pueden correlacionar directamente con las especies de diferente número de brazos.



Esquema 3.14: Estructuras químicas de glicerol a) trisustituido, b) disustituido y c) monosustituido con policaprolactona, mostrando las asignaciones del espectro ^1H NMR.

El **Esquema 3.14** muestra las estructuras químicas de las especies sustituidas de glicerol. Los hidrógenos de grupos metino de glicerol mono, di y trisustituido, se nombran como a_1 , a_2 y a_3 respectivamente; los hidrógenos de grupos metileno de

glicerol mono y disustituido se indican como b_1 ; los hidrógenos de grupos metileno de glicerol trisustituido se nombran como b_2 ; los hidrógenos de grupos metileno de caprolactona adyacentes a grupos hidroxilo terminales corresponden a c ; y los hidrógenos de grupos metileno de caprolactona adyacentes a grupos éster de la unidad repetitiva se indican como c' .

A modo de ejemplo, en la **Figura 3.4** se muestra el espectro de ^1H NMR para PCL estrella sintetizada con una relación $[\varepsilon\text{-CL}:\text{OH}]$ de [8:1].

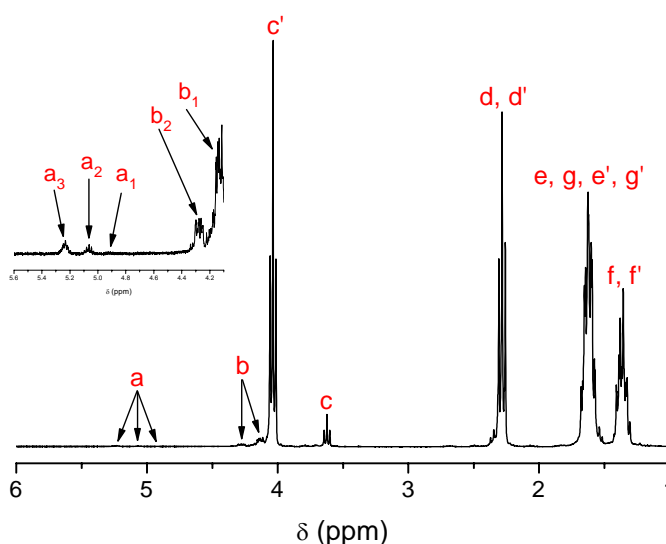


Figura 3.4: Espectro de ^1H NMR de PCL estrella con relación $[\varepsilon\text{-CL}:\text{OH}]$ de [8:1].

Los porcentajes de especies de PCL con uno, dos y tres brazos (PCL_1 , PCL_2 y PCL_3 , respectivamente) se determinaron entonces a partir de las integraciones de los protones a en el espectro de ^1H NMR. Se muestra como ejemplo el cálculo para PCL_3 :

$$PCL_3 (\%) = \frac{a_3}{a_1 + a_2 + a_3} \cdot 100$$

Por su parte, el porcentaje de grupos hidroxilo reaccionados con $\varepsilon\text{-CL}$ se determinó de la siguiente manera:

$$OH \text{ reaccionados } (\%) = \frac{3 \cdot PCL_3 + 2 \cdot PCL_2 + 1 \cdot PCL_1}{3}$$

La funcionalidad efectiva (f_e) del iniciador glicerol, teniendo en cuenta sólo los grupos hidroxilo que actuaron como iniciadores de la polimerización, se determinó a partir de la ecuación:

$$f_e = \frac{3 \cdot PCL_3 + 2 \cdot PCL_2 + 1 \cdot PCL_1}{100}$$

La longitud promedio de cadenas de PCL (Ln) se calculó a partir de las integraciones de las señales de **c** y **c'**:

$$Ln = \frac{c + c'}{c}$$

Finalmente, se obtuvieron los valores de peso molecular promedio en número (Mn_{NMR}) para las PCL estrella sintetizadas:

$$Mn_{NMR} \text{ (Da)} = M_{\text{glicerol}} + f_e \cdot Ln \cdot M_{\varepsilon\text{-CL}}$$

En la **Tabla 3.3** se presentan los resultados obtenidos mediante ^1H NMR para PCL sintetizadas con distinta relación $[\varepsilon\text{-CL}:\text{OH}]$ empleando glicerol como iniciador.

Tabla 3.3: Resultados obtenidos por ^1H NMR para los polímeros iniciados por glicerol.

f_t^a	Relación [$\varepsilon\text{-CL}:\text{OH}$]	f_e^b	OH reaccionados (%)	Número de brazos (%)			Ln^c	Mn_t^d (Da)	Mn_{NMR} (Da)
				1	2	3			
	2 : 1	2,1	71,1	20,1	46,4	33,5	4,5	777	1170
3	3 : 1	2,5	83,5	5,2	39,2	55,6	6,3	1119	1890
	8 : 1	2,7	89,1	1,1	30,6	68,3	13,1	2832	4130

^a Funcionalidad teórica según el número de hidroxilos del iniciador.

^b Funcionalidad efectiva determinada por ^1H NMR (comparando las integraciones de **a**₃, **a**₂ y **a**₁, a 5,25, 5,07 y 4,90 ppm, respectivamente).

^c Longitud promedio de cadenas de PCL determinada por ^1H NMR (comparando las integraciones de **c'** y **c**, a 4,05 y 3,65 ppm, respectivamente).

^d Mn teórico calculado de acuerdo a la relación $[\varepsilon\text{-CL}:\text{OH}]$.

Las funcionalidades efectivas obtenidas fueron menores a la teórica y aumentaron con el incremento de la relación $[\varepsilon\text{-CL}:\text{OH}]$. Lo mismo puede observarse

considerando el porcentaje de grupos hidroxilo de glicerol que participaron en la reacción de polimerización en cada caso (porcentaje de *OH reaccionados*).

La abundancia de la especie PCL_3 aumentó con el incremento de la relación $[\varepsilon\text{-CL:OH}]$, a expensas de las especies PCL_1 y PCL_2 . Esto puede observarse claramente en la **Figura 3.5**. Las longitudes promedio de cadenas resultaron mayores a las teóricas, disminuyendo la desviación con el aumento de la relación $[\varepsilon\text{-CL:OH}]$, debido al aumento de la abundancia de la especie PCL_3 .

Finalmente, los valores de M_n obtenidos ($M_{n,NMR}$) fueron aproximadamente un 50 % mayores que los esperados de acuerdo a la relación $[\varepsilon\text{-CL:OH}]$. Esta sobreestimación del valor de M_n indica que la técnica tiene alta potencialidad para la determinación de estructuras y es menos exacta para la estimación de pesos moleculares.

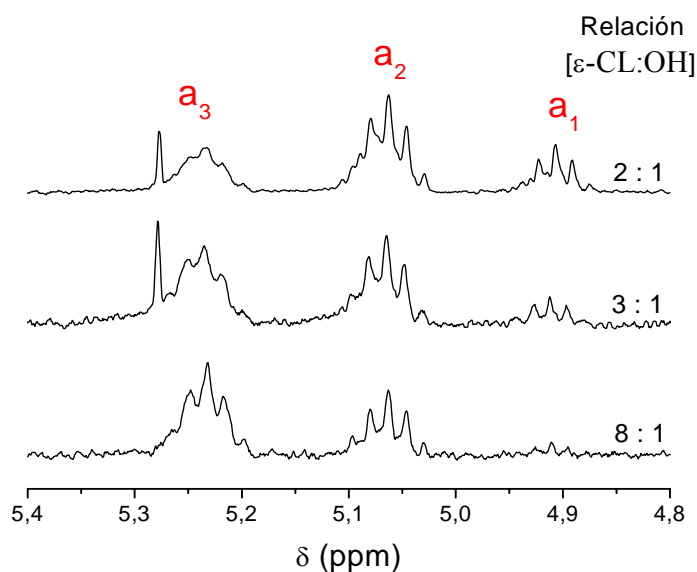


Figura 3.5: Espectros de ^1H NMR de los compuestos PCL estrella iniciados por glicerol con diferentes relaciones estequiométricas de $[\varepsilon\text{-CL:OH}]$ en la región que permite determinar los porcentajes de especies con distinto número de brazos. a_1 , a_2 y a_3 corresponden a los hidrógenos de grupos metino de glicerol mono, di y trisustituido.

3.3.2.1.2 Análisis comparativo de los resultados obtenidos mediante otras técnicas

En la **Tabla 3.4** se resumen los resultados de pesos moleculares obtenidos mediante las técnicas de titulación, SEC y NMR.

Tabla 3.4: Valores de pesos moleculares obtenidos por diferentes técnicas para PCL estrella iniciadas por glicerol.

Relación [ϵ -CL : OH]	Mn_i^a	Mn_{tit}^b	Mn_{NMR}	SEC		
				Mn	Mw	$P.I.$
2 : 1	777	1060	1170	1690	2680	1,6
3 : 1	1119	1280	1890	2380	3660	1,5
8 : 1	2832	3130	4130	5430	8280	1,5

^a Mn teórico calculado de acuerdo a la relación [ϵ -CL:OH].

^b Titulación por el método de anhídrido ftálico.

Los valores de Mn obtenidos por titulación resultaron superiores a los teóricos (Mn_i) en todos los casos, y se aproximaron más a estos últimos al aumentar la relación [ϵ -CL:OH].

Los valores de Mn obtenidos a partir del análisis de los espectros de NMR resultaron mayores que los teóricos y que los obtenidos mediante la técnica de titulación, mostrando diferentes desviaciones para las distintas relaciones [ϵ -CL:OH].

Los datos obtenidos por SEC mostraron que la polidispersidad de los materiales resultó independiente de la relaciones [ϵ -CL:OH] estudiadas. En todos los casos, los valores de Mn obtenidos por SEC resultaron muy superiores a los teóricos y a los calculados mediante las otras técnicas, debido a que la calibración se realizó con patrones de poliestireno, que presenta una estructura química y comportamiento hidrodinámico muy diferentes al de los polímeros estrella analizados.

Finalmente, los valores de Mn obtenidos mediante la técnica de titulación resultaron en todos los casos los más próximos a los valores teóricos, y fueron los empleados en la síntesis de redes poliuretánicas (**Capítulo 10**).

3.3.2.1.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El análisis térmico mediante DSC (**Tabla 3.5**) mostró que todos los polímeros sintetizados son semicristalinos, morfología característica de PCL con Mn mayores a 1000 Da. Las temperaturas de transición vítrea y de fusión, y el porcentaje de cristalinidad de los materiales aumentaron con el incremento de la relación [ϵ -CL:OH].

Esta observación es consistente con el aumento del peso molecular, el cual conduce a mayor cristalinidad y en consecuencia a mayor T_g y T_m .

Tabla 3.5: Propiedades térmicas de PCL iniciadas por glicerol.

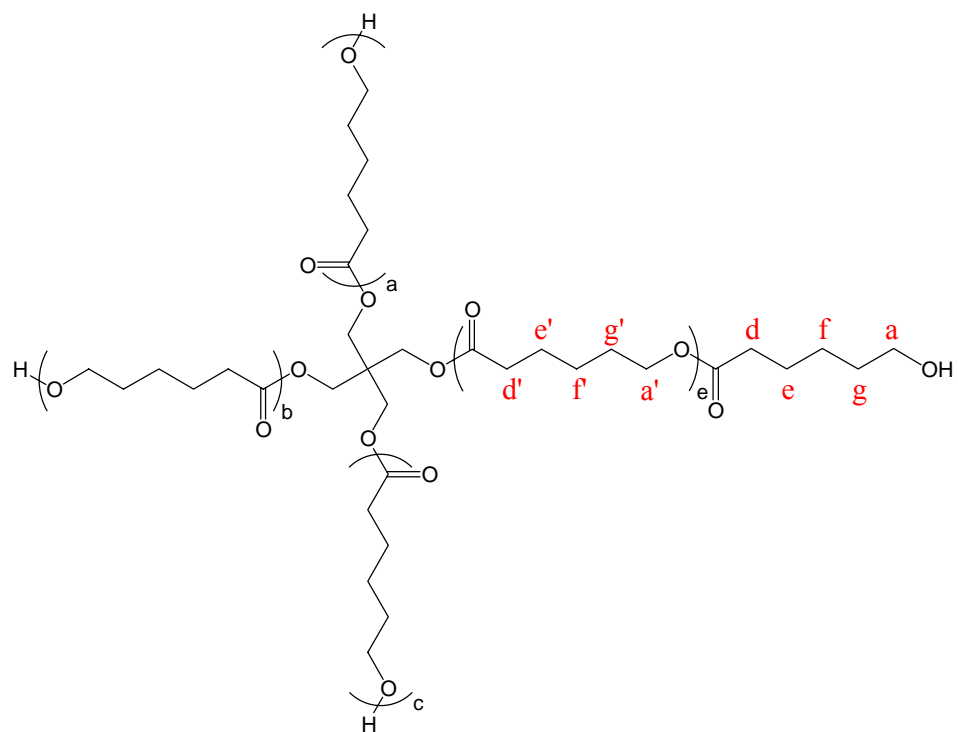
Reactivos	Relación (ϵ -CL : OH)	DSC		
		T_g (°C)	T_m (°C)	X_c (%)
Glicerol + ϵ -CL	2 : 1	-74,5	47,8	47,7
	3 : 1	-71,9	51,1	54,7
	8 : 1	-64,3	54,3	68,1

3.3.2.2 Caracterización de poli(ϵ -caprolactona) de cuatro brazos

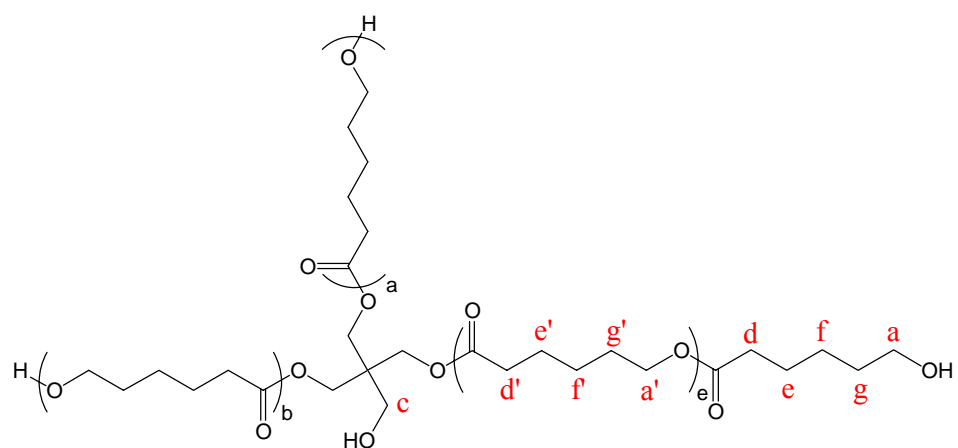
3.3.2.2.1 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H NMR)

Como en el caso de PCL de tres brazos, el análisis por espectroscopía de ^1H NMR aportó considerable información estructural [19]. La presencia de cuatro grupos hidroxilo por molécula de pentaeritritol permite la participación de hasta cuatro grupos reactivos en la iniciación de la polimerización por apertura de anillo de ϵ -CL. Como en el caso de glicerol, el impedimento estérico producido por las cadenas en crecimiento adyacentes a grupos hidroxilo conduce a una mezcla de especies con distinto grado de sustitución.

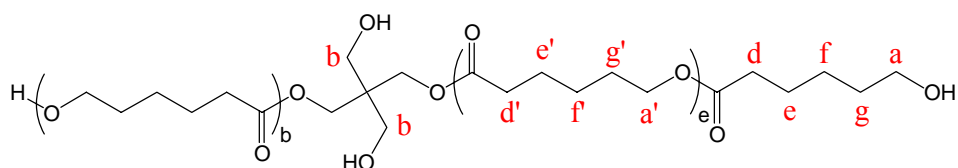
El **Esquema 3.15** muestra las estructuras químicas posibles de las especies sustituidas de pentaeritritol. Los hidrógenos de grupos metileno de caprolactona adyacentes a grupos hidroxilo terminales se nombran como **a**; los hidrógenos de grupos metileno de caprolactona adyacentes a grupos éster de la unidad repetitiva se indican como **a'**; y los hidrógenos de grupos metileno de pentaeritritol adyacentes a grupos hidroxilo terminales no esterificados con ϵ -caprolactona en PCL estrella con dos y tres brazos, corresponden respectivamente a **b** y **c**.



a)



b)



c)

Esquema 3.15: Estructuras químicas de pentaeritritol a) tetrasustituido, b) trisustituido y c) disustituido con policaprolactona, mostrando las asignaciones del espectro ^1H NMR.

A modo de ejemplo, se muestra el espectro de ^1H NMR de PCL estrella iniciada por pentaeritritol con $[\varepsilon\text{-CL:OH}] = [8:1]$ (**Figura 3.6**).

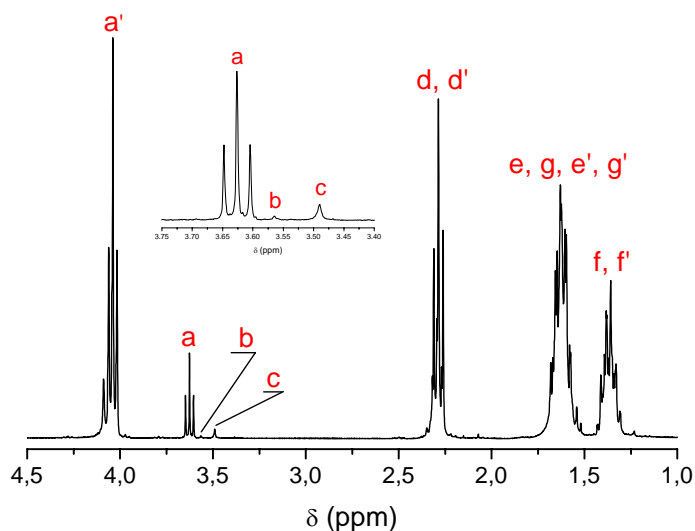


Figura 3.6: Espectro de ^1H NMR de PCL estrella con relación $[\varepsilon\text{-CL:OH}] = [8:1]$.

La abundancia relativa de especies con distinto número de brazos de PCL se determinó a partir de las siguientes ecuaciones:

$$2 \cdot P_2 + 3 \cdot P_3 + 4 \cdot P_4 = a \qquad P_3 = c \qquad P_2 = \frac{b}{2}$$

Luego se normalizaron los valores, dando como resultado los porcentajes finales de especies con dos, tres y cuatro brazos de PCL (PCL_2 , PCL_3 y PCL_4 , respectivamente). Se muestra como ejemplo el cálculo para PCL_4 :

$$PCL_4 (\%) = \frac{P_4}{P_2 + P_3 + P_4} \cdot 100$$

El porcentaje de grupos hidroxilo reaccionados con $\varepsilon\text{-CL}$ se determinó como:

$$OH \text{ reaccionados } (\%) = \frac{a}{a + b + c} \cdot 100$$

La funcionalidad efectiva (f_e) del iniciador pentaeritritol, teniendo en cuenta sólo los grupos hidroxilo que actuaron como iniciadores de la polimerización, se determinó a partir de la ecuación:

$$f_e = \frac{4 \cdot PCL_4 + 3 \cdot PCL_3 + 2 \cdot PCL_2}{100}$$

Por su parte, la longitud promedio de cadenas de PCL (Ln) se calculó a partir de las integraciones de las señales de **a'** y **a**:

$$Ln = \frac{a' + a}{a}$$

Finalmente, se obtuvieron los valores de peso molecular promedio en número (Mn_{NMR}) para las PCL estrella sintetizadas:

$$Mn_{NMR} \text{ (Da)} = M_{\text{pentaeritritol}} + f_e \cdot Ln \cdot M_{\varepsilon\text{-CL}}$$

En la **Tabla 3.6** se presentan los resultados obtenidos mediante ^1H NMR para los productos sintetizados con distintas relación $[\varepsilon\text{-CL:OH}]$ empleando pentaeritritol como iniciador.

Tabla 3.6: Resultados obtenidos por ^1H NMR para los polímeros iniciados por pentaeritritol.

f_t^a	Relación [$\varepsilon\text{-CL} : \text{OH}$]	f_e^b	OH reaccionados (%)	Número de brazos (%)			Ln^c	Mn_t^d (Da)	Mn_{NMR} (Da)
				2	3	4			
	8 : 1	3,5	86,4	5,4	43,2	51,3	8,7	3789	3610
4	15 : 1	3,4	85,1	10,2	39,2	50,6	13,6	6985	5410
	30 : 1	3,7	91,8	4,9	23,6	71,6	20,4	13834	8750

^a Funcionalidad teórica según el número de hidroxilos del iniciador.

^b Funcionalidad efectiva determinada por ^1H NMR (comparando las integraciones de **a**, **b** y **c**, a 3,63, 3,56 y 3,49 ppm, respectivamente).

^c Longitud promedio de cadenas de PCL determinada por ^1H NMR (comparando las integraciones de **a'** y **a**, a 4,05 y 3,63 ppm, respectivamente).

^d Mn teórico calculado de acuerdo a la relación $[\varepsilon\text{-CL:OH}]$.

Las funcionalidades efectivas (f_e) obtenidas fueron menores a la teórica (f_i). A diferencia del resultado obtenido para los productos derivados de glicerol, en este caso no se observó una relación entre la funcionalidad y la alimentación de la reacción. Lo mismo pudo observarse considerando el porcentaje de grupos hidroxilo que actuaron como iniciadores efectivos de la polimerización (porcentaje de *OH reaccionados*). El porcentaje de grupos hidroxilo sin reaccionar fue inferior al 15% en todos los casos.

Como era de esperar, la abundancia de la especie PCL_4 fue mayor para el caso de la relación $[\epsilon\text{-CL:OH}]$ de [30:1]. Sin embargo, no se observó un aumento gradual de la abundancia de esta especie con el incremento de la relación $[\epsilon\text{-CL:OH}]$. Lo mismo resultó para el caso de la especie PCL_2 , cuya disminución al aumentar la relación $[\epsilon\text{-CL:OH}]$ no ocurrió de la forma esperada. La especie PCL_3 , por su parte, mostró una disminución gradual al aumentar la relación $[\epsilon\text{-CL:OH}]$ (**Figura 3.7**).

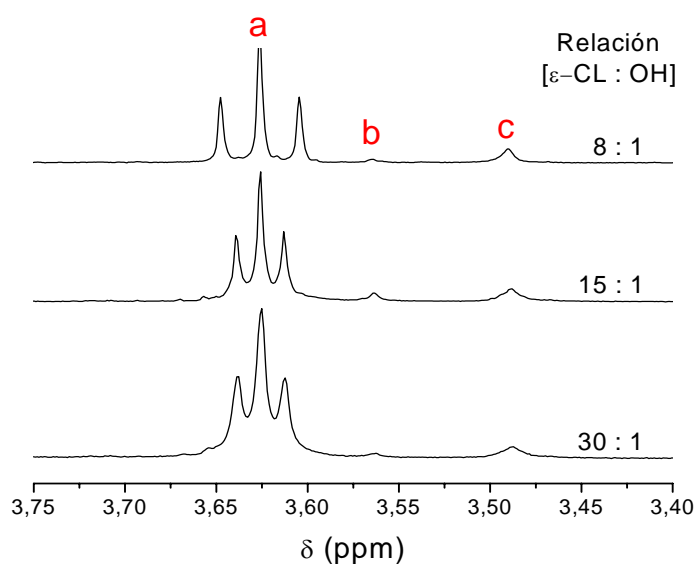


Figura 3.7: Espectros de ^1H NMR de PCL estrella iniciadas por pentaeritritol con diferentes relaciones estequiométricas de $[\epsilon\text{-CL:OH}]$ en la región que permite determinar los porcentajes de especies con distinto número de brazos. **a**, **b** y **c** corresponden a hidrógenos de grupos metileno adyacentes a grupos hidroxilo terminales.

En el caso de la relación $[\epsilon\text{-CL:OH}]$ de [8:1], la longitud promedio de cadenas (L_n) resultó ligeramente mayor a la teórica, aunque la desviación aumentó en sentido inverso con el incremento de la relación $[\epsilon\text{-CL:OH}]$. Los valores de Mn_{NMR} fueron

inferiores a los teóricos, y la desviación se hizo más notable con el aumento del peso molecular.

3.3.2.2.2 Análisis comparativo de los resultados obtenidos mediante otras técnicas

En la **Tabla 3.7** se resumen los resultados de pesos moleculares obtenidos mediante las técnicas de titulación, SEC y NMR.

Tabla 3.7: Valores de pesos moleculares obtenidos por diferentes técnicas para PCL estrella iniciadas por pentaeritritol.

Relación [ϵ -CL : OH]	Mn_t^a	Mn_{tit}^a	Mn_{NMR}	SEC		
				Mn	Mw	$P.I.$
8 : 1	3789	3320	3610	5600	7120	1,3
15 : 1	6985	6880	5410	6070	12680	2,1
30 : 1	13834	14020	8750	7180	21280	3,0

^a Mn teórico calculado de acuerdo a la relación [ϵ -CL:OH].

^b Titulación por el método de anhídrido ftálico.

La técnica de titulación de grupos terminales recomendada por ASTM D4274-99 proporcionó valores de Mn muy próximos a los calculados en base a la relación [ϵ -CL:OH] (Mn_t), lo cual indica que la eficiencia de la síntesis fue elevada. Los valores obtenidos resultaron inferiores a los teóricos, excepto en caso de la relación [ϵ -CL:OH] más alta, y se aproximaron mucho más a estos últimos al aumentar la relación [ϵ -CL:OH].

A diferencia de lo observado para los polímeros derivados de glicerol, los valores de Mn obtenidos a partir de los espectros de NMR de los derivados de pentaeritritol resultaron menores que los teóricos en todos los casos, y menores que los obtenidos mediante la técnica de titulación, excepto para la relación [ϵ -CL:OH] más baja. Estas desviaciones disminuyeron considerablemente a menor relación [ϵ -CL:OH].

En contraposición a lo observado en caso de los polímeros derivados de glicerol, los datos obtenidos por SEC mostraron que la polidispersidad aumentó considerablemente al incrementarse la relación [ϵ -CL:OH] debido a la existencia de

reacciones de transesterificación que se favorecen al trabajar con relaciones $[\epsilon\text{-CL:OH}]$ más elevadas, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ y las condiciones de reacción empleadas [20].

Los valores de M_n obtenidos por SEC resultaron inferiores a los teóricos, excepto para la relación $[\epsilon\text{-CL:OH}]$ más baja. La desviación fue menor en caso de la relación $[\epsilon\text{-CL:OH}]$ intermedia, y cercana al 50 % para las otras. Nuevamente, esta desviación puede atribuirse al uso de patrones de poliestireno en la calibración, polímero con estructura muy diferente a la de los polímeros estrella estudiados.

Finalmente, los valores de M_n obtenidos mediante la técnica de titulación resultaron casi idénticos a los valores teóricos, excepto en el caso de la relación $[\epsilon\text{-CL:OH}] = 8:1$, en que la desviación resultó un 13 % inferior.

3.3.2.2.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El análisis térmico mediante DSC (**Tabla 3.8**) evidenció, como era de esperar, que todos los polímeros sintetizados son semicristalinos. Al igual que lo observado en caso de los poliésteres iniciados por glicerol, al incrementar la relación $[\epsilon\text{-CL:OH}]$, aumentó también la T_m y X_c . Para $[\epsilon\text{-CL:OH}] = [8:1]$, el polímero iniciado por pentaeritritol presentó T_m y X_c menores que el iniciado por glicerol, lo que puede atribuirse al mayor número de brazos que dificultan la cristalización de PCL en mayor extensión. A diferencia de lo observado para los derivados de glicerol, en caso de los iniciados por pentaeritritol, los valores de T_g se mantuvieron aproximadamente constantes para las diferentes relaciones $[\epsilon\text{-CL:OH}]$ estudiadas, y similares al valor de T_g obtenido para el derivado de glicerol de mayor relación $[\epsilon\text{-CL:OH}]$.

Tabla 3.8: Propiedades térmicas de PCL iniciada por pentaeritritol.

Reactivos	Relación $[\epsilon\text{-CL} : \text{OH}]$	DSC		
		T_g (°C)	T_m (°C)	X_c (%)
Pentaeritritol + $\epsilon\text{-CL}$	8 : 1	-66,5	49,2	59,3
	15 : 1	-64,9	56,0	64,9
	30 : 1	-65,6	59,4	68,6

3.4 Conclusiones parciales

Se sintetizaron satisfactoriamente los poliésteres poli(ϵ -caprolactona) diol (lineal) y poli(ϵ -caprolactona) estrella con distinto peso molecular iniciadas por glicerol y pentaeritritol. El análisis de su estructura química mediante espectroscopía de ^1H NMR, reveló la presencia de especies con diferente número de brazos, aún en los casos de emplear polioles que poseen inicialmente grupos hidroxilo equivalentes, tales como trietilenglicol y pentaeritritol. La abundancia relativa de dichas especies dependió de la alimentación de la reacción.

La técnica de titulación de grupos hidroxilo terminales con anhídrido ftálico resultó la más eficiente para determinar con precisión los valores de M_n .

La PCL diol presentó un bajo índice de polidispersidad, factor importante para la obtención de segmentos uniformes en la síntesis de poli(éster uretanos). Los poliésteres estrella mostraron valores de polidispersidad superiores, dependientes de la alimentación y la presencia de un porcentaje mayor de especies multisustituidas.

En los poliésteres estrella el valor de T_g mostró una dependencia marcada con el M_n y la cristalinidad hasta valores de X_c de 60 %. Todos los poliésteres sintetizados resultaron semicristalinos, con valores de T_m entre 48 y 60 °C. La cristalinidad de los poliésteres estrella aumentó con el incremento del peso molecular en cada serie. Sin embargo, en los poliésteres de peso molecular similar, el iniciado por glicerol resultó más cristalino. Esto indica que la cristalización se dificulta con el aumento del número de brazos y la disminución del peso molecular.

3.5 Referencias

- [1] Jérôme C., Lecomte P. Recent advances in the synthesis of aliphatic polyesters by ring-opening polymerization. *Adv Drug Del Rev* 60: 1056–1076, **2008**.
- [2] Abraham G.A., Marcos-Fernández A., San Román, J. Bioreabsorbable poly(ester ether urethane)s from L-lysine diisocyanate and triblock copolymers with different hydrophilic character. *J Biomed Mater Res Part A*, 76A (4): 729–736, **2006**.
- [3] Cohn D., Stern T., Gonzalez M.F., Epstein J. Biodegradable poly(ethylene oxide)/poly(ϵ -caprolactone) multiblock copolymers. *J Biomed Mater Res*, 59 (2): 273–281, **2002**.

- [4] Gorna K., Gogolewski S. Novel biodegradable polyurethanes for medical applications, en *Synthetic bioabsorbable polymers for implants* (Agrawal C.M., Parr J.E., Lin S.T. eds.), ASTM STP 1396, American Society for Testing and Materials, West Conshohocken (PA), 39–57, **2000**.
- [5] Gorna K., Gogolewski S. Biodegradable polyurethanes for implants. II. *In vitro* degradation and calcification of materials from poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene oxide) diols and various chain extenders. *J Biomed Mater Res*, 60 (4): 592–606, **2002**.
- [6] Gorna K., Gogolewski S. *In vitro* degradation of novel medical biodegradable aliphatic polyurethanes based on ϵ -caprolactone and Pluronics with various hydrophilicities. *Polym Deg Stab*, 75 (1): 113–122, **2002**.
- [7] Gogolewski S., Gorna K., Turner A.S. Regeneration of bicortical defects in the iliac crest of estrogen-deficient sheep, using new biodegradable polyurethane bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res Part A*, 77A (4): 802–810, **2006**.
- [8] Marcos-Fernández A., Abraham G.A., Valentín J.L., San Román J. Synthesis and characterization of biodegradable non-toxic poly(ester–urethane–urea)s based on poly(ϵ -caprolactone) and amino acid derivatives. *Polymer*, 47 (3): 785–798, **2006**.
- [9] Heijkants R.G.J.C., van Calck R.V., van Tienen T.G., de Groot J.H., Buma P., Pennings A.J., Veth R.P.H., Schouten A.J.. Uncatalyzed synthesis, thermal and mechanical properties of polyurethanes based on poly(ϵ -caprolactone) and 1,4-butane diisocyanate with uniform hard segment. *Biomaterials*, 26 (20): 4219–4228, **2005**.
- [10] Abraham G.A., Elvira C., Gallardo A., San Román J. Polímeros Biodegradables en *Ciencia y Tecnología de Materiales Poliméricos* (Garrido L., Ibarra L., Marco C. eds.), Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, CSIC, Madrid. España, Vol II, Cap 29, 573–586, **2004**.
- [11] Stridsberg K.M., Ryner M., Albertson A-C. Controlled ring-opening polymerization: polymers with designed macromolecular architecture, en *Degradable Aliphatic Polyesters* (Albertson A-C ed.), Serie: Advances in Polymer Science, vol 157, Springer, Berlín, 41–65, **2002**.
- [12] International Union of Pure and Applied Chemistry, Macromolecular Division, Commission on Macromolecular Nomenclature, Glossary of Basic Terms in Polymer

Science. Jenkins A.D., Kratochvíl P., Stepto R.F.T., Suter U.W. IUPAC Recommendations **1996**.

[13] Kricheldorf H.R., Kreiser-Saunders I., Boettcher C. Poly lactones: 31. Sn(II)octoate-initiated polymerization of L-lactide: a mechanistic study. *Polymer*, 36 (6): 1253–1259, **1995**.

[14] Kowalski A., Duda A., Penczek S. Kinetics and mechanism of cyclic esters polymerization initiated with tin(II) octoate. 1. Polymerization of ϵ -caprolactone. *Macromol Rapid Commun*, 19 (11): 567–572, **1998**.

[15] Dee L.A., Biggers B.L., Fiske M.E. *N*-methylimidazole as a Catalyst for Acetylation of Hydroxyl Terminated Polymers. *Anal Chem*, 52 (3): 573–575, **1980**.

[16] ASTM D 4274-99: Standard Test Methods for Testing PU Raw Materials: Determination of Hydroxyl Numbers of Polyols).

[17] Van Krevelen D.W. Properties of polymers. Amsterdam: Elsevier, p. 121, **1990**.

[18] Lang M., Wong R.P., Chu C.C. Synthesis and structural analysis of functionalized poly(ϵ -caprolactone)-based three-arm star polymers. *J Polym Sci Part A: Polym Chem*, 40 (8): 1127–1141, **2002**.

[19] Maglio G., Nese G., Unzo M., Palumbo R. Synthesis and Characterization of Star-Shaped Diblock Poly(ϵ -caprolactone)/Poly(ethylene oxide) Copolymers. *Macromol Rapid Commun*, 25 (12): 1139–1144, **2004**.

[20] Albertsson A-C., Varma I.K. Recent Developments in Ring Opening Polymerization of Lactones for Biomedical Applications. *Biomacromolecules*, 4 (6): 1466–1486, **2003**.

CAPÍTULO 4

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE EXTENDEDORES DE CADENA CON GRUPOS FUNCIONALES ESPECÍFICOS

4.1 Introducción

Los extendedores de cadena confieren propiedades específicas a los poliuretanos, y poseen un rol clave, dado que su incorporación en la cadena macromolecular combinado con los diisocianatos conduce a la formación de microfases separadas [1]. Por lo tanto, la estructura y naturaleza química de los extendedores son de crucial importancia en el proceso de separación de fases. Prácticamente cualquier di- o poli-ol, di- o poliamina, o hidroxilamina, alifático o aromático, puede emplearse como extensor de cadena o entrecruzante. El uso de uno u otro compuesto está limitado por la toxicidad, la facilidad de procesamiento (líquido de punto de ebullición y presión de vapor relativamente altos o sólido de bajo punto de fusión; solubilidad en los otros componentes de la formulación) y el precio.

Existen numerosos ejemplos en literatura de extendedores de cadena empleados en síntesis de poliuretanos segmentados biodegradables de uso biomédico. Entre ellos se incluyen:

- diaminas de cadena corta, como 1,4-butanodiamina (BDA, putrescina) [2-5];
- aminoácidos o derivados de aminoácidos, como etil éster de L-lisina o etil éster de L-ornitina [6,7] y diéster derivado de L-fenilalanina [8,9];
- dioles de cadena corta, como 1,4-butanodiol (BDO) [5,10,11], 1,4:3,6-dianhidro-D-sorbitol [12], ciclohexano dimetanol [13], diclorhidrato de etambutol [14], 1,3-propanodiol [15], 3-hexino-2,5-diol [16], y compuestos formados por tribloques como BDO-BDI-BDO [5,17];
- amino-dioles de cadena corta, como 2-amino-1-butanol [12];
- compuestos con grupos sulfhidrilo, como 2-mercaptoetil éter [12]; y
- diurea-difenoles de cadena corta, derivados de tiramina o tirosina [18,19].

Incluso se ha empleado agua para producir segmentos duros de diferentes longitudes a través de la formación de enlaces urea [20].

4.1.1 Diseño de extendedores de cadena funcionales

La formulación de poli(éster uretanos) biorreabsorbibles requiere de una cuidadosa selección de monómeros. La toxicidad de los productos de degradación constituye uno de los principales problemas que limitan el empleo de numerosos compuestos ampliamente utilizados en la química de los poliuretanos.

Como se ha mencionado anteriormente, la estructura química del diisocianato y del extendedor de cadena influyen en la extensión de la separación de microfases. Los diisocianatos aromáticos favorecen este proceso por tener mayor incompatibilidad química con las cadenas de poliéster alifático. Sin embargo, como se discutió en la **Sección 1.3.2.1**, estos compuestos forman diaminas aromáticas de elevada toxicidad como subproductos de degradación. Los diisocianatos alifáticos producen diaminas alifáticas de baja toxicidad, sin embargo poseen una mayor compatibilidad química que afecta la extensión de la separación de fases.

Por este motivo, los extendedores de cadena toman un rol preponderante en la separación de fases de poliuretanos biorreabsorbibles para aplicaciones biomédicas. El diseño apropiado de su estructura química permite incorporar grupos funcionales específicos con un interés particular, como por ejemplo incrementar las fuerzas de atracción entre cadenas adyacentes del poliuretano, o introducir enlaces que contribuyan a la degradación hidrolítica o enzimática. En el primer caso, la incorporación de grupos urea en el extendedor incrementa la interacción entre los segmentos duros de cadenas adyacentes a través de la formación de enlaces puente de hidrógeno bidentados entre estos grupos funcionales. La presencia de grupos aromáticos aumenta la rigidez de la cadena principal y contribuye a conformar la estructura supramolecular. La atracción entre las nubes electrónicas π de anillos aromáticos adyacentes también favorece la formación de dominios duros por atracción entre los segmentos duros [18]. En el segundo caso, el diseño de extendedores de cadena permite introducir enlaces hidrolizables en los segmentos duros, como por ejemplo, grupos éster o enlaces atacables por enzimas específicas.

Teniendo en cuenta estas consideraciones sobre la estructura química del extendedor de cadena y su rol en la separación de fases, en este capítulo se describe la síntesis y caracterización de tres nuevos extendedores de cadena alifáticos, dos de ellos conteniendo grupos urea, y el tercero incluyendo dos anillos aromáticos y dos grupos éster en su estructura.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Materiales

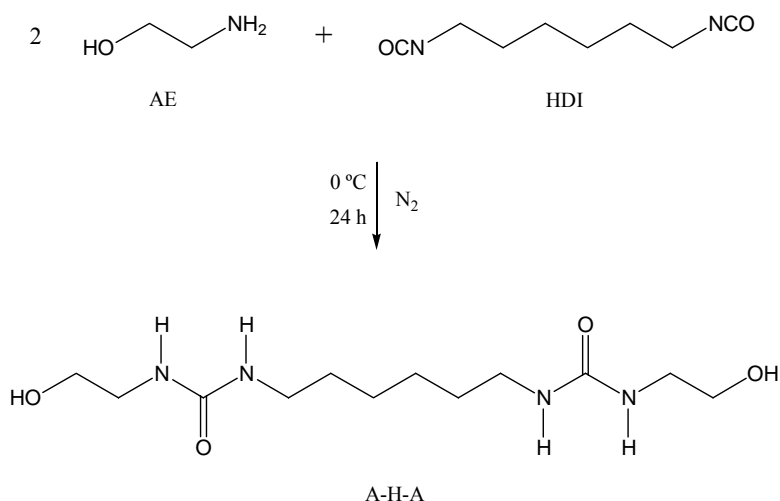
2-aminoetanol (AE), 1,6-hexametilendiisocianato (HDI), ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico (desaminotirosina, DAT), etilenglicol (EG), ácido p-toluensulfónico (p-TsOH), *N,N'*-dimetilacetamida (DMAc), dimetilsulfóxido (DMSO), tetrahidrofurano (THF) y tolueno se compraron a Aldrich Chemical Co. 2,6-diisocianatohexanoato de metilo (metil éster de diisocianato de L-lisina, LDI) fue donado por Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., Japón. EG y p-TsOH se secaron bajo vacío a 60 °C por 24 horas antes de usar. La DMAc se purificó mediante secado con tamices moleculares (4 Å) y se destiló a 60 °C a presión reducida (10 torr, T_{eb} DMAc = 165 °C). El resto de los reactivos se utilizó sin una purificación previa.

4.2.2 Síntesis de nuevos extendedores de cadena

4.2.2.1 Síntesis de extendedor de cadena diurea-diol (A-H-A)

La síntesis de los extendedores de cadena se llevó a cabo luego de buscar las condiciones experimentales (temperatura, solventes, concentraciones, relaciones molares de reactivos) más apropiadas para la obtención de un producto con alto rendimiento, pureza y reproducibilidad. En el caso del A-H-A, la síntesis se realizó partiendo de una solución de HDI 10 % p/v DMAc que se agregó gota a gota desde embudo de adición sobre una solución de AE 10 % p/v DMAc, con agitación y burbujeo de nitrógeno en baño de hielo, y se dejó reaccionar durante 24 horas (**Esquema 4.1**). Se empleó una relación molar [AE:HDI] de [2:1]. El producto obtenido resultó insoluble en el medio de reacción, precipitando como un sólido blanco.

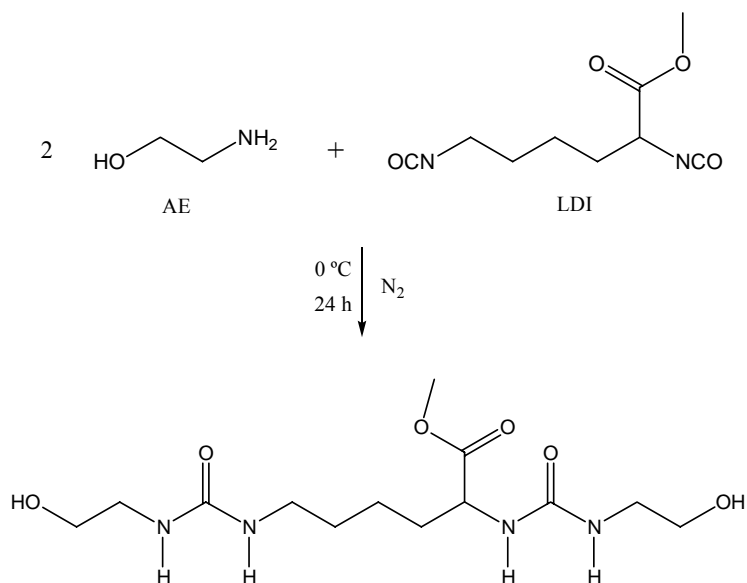
La conversión completa se confirmó por la ausencia del pico de isocianato ($2270\text{-}2280\text{ cm}^{-1}$) en el espectro infrarrojo del sobrenadante. El solvente se eliminó por destilación a 45 °C bajo vacío. El sólido obtenido se lavó dos veces con THF (5 % p/v) en ebullición durante 40 minutos para asegurar la eliminación completa del solvente residual. Luego de cada lavado la solución se guardó a 2 °C durante 3 horas, y después se filtró, secó y pulverizó en un mortero. El polvo blanco obtenido se guardó bajo vacío. La reacción tuvo un rendimiento de 90 %.



Esquema 4.1: Síntesis de extendedor de cadena diurea-diol.

4.2.2.2 Síntesis de extendedor de cadena urea-diol (A-L-A)

Una solución de LDI 10 % p/v DMAc se agregó gota a gota desde embudo de adición sobre una solución de AE 10 % p/v DMAc, con agitación y burbujeo de nitrógeno en baño de hielo, y se dejó reaccionar durante 24 horas. La mezcla de reacción se tornó ligeramente amarillenta. Se empleó una relación molar [AE:LDI] de [2:1]. El producto obtenido resultó soluble en el medio de reacción. En el **Esquema 4.2** se muestra la estructura molecular esperada para el extendedor.



Esquema 4.2: Síntesis de extendedor de cadena urea-diol (estructura química esperada).

La conversión completa se confirmó por la ausencia del pico de isocianato ($2265\text{-}2275\text{ cm}^{-1}$) en el espectro de infrarrojo del sobrenadante. Posteriormente, la DMAc se destiló a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo vacío. El sólido amarillento obtenido se lavó dos veces con THF (5 % p/v) en ebullición durante 40 minutos. El lavado permitió la eliminación completa del solvente residual. Luego de cada lavado la solución se guardó a $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas, y después se filtró, secó y pulverizó en un mortero. El polvo blanco obtenido se guardó bajo vacío. La reacción tuvo un rendimiento de 88 %.

4.2.2.3 Síntesis de extendedor de cadena diéster-difenol (D-E-D)

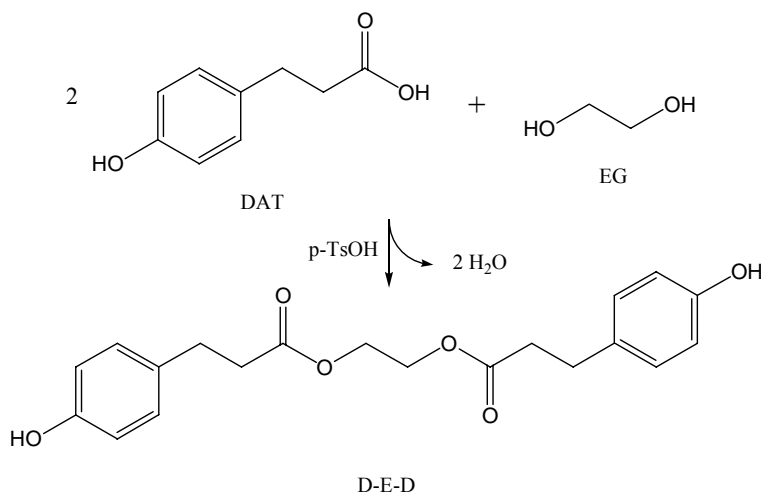
La síntesis del extendedor diéster-difenol se efectuó mediante la esterificación de DAT con EG, para lo cual se exploraron rutas sintéticas diferentes.

En primer lugar se llevó a cabo la reacción en masa con una relación molar [DAT:EG] de [2:1] a $140\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta reacción condujo a la formación de un producto aceitoso de color marrón que no se pudo purificar, probablemente compuesto por una mezcla de subproductos de degradación y reactivos de partida.

Como alternativa se empleó la técnica reportada por Hooper y Kohn [21], en donde se esterifica el grupo ácido carboxílico de tirosina con diversos alcoholes. La ruta sintética seguida consistió en la formación del cloruro de ácido mediante la reacción de DAT con exceso de cloruro de tionilo (SOCl_2) a reflujo ($80\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 4 horas. Posteriormente el exceso de SOCl_2 se destiló bajo vacío y se aisló el cloruro de desaminotirosina. El segundo paso consistió en la reacción de esterificación del derivado de ácido con EG en relación molar [2:1] en presencia de trietilamina. Esta amina terciaria neutraliza el ácido clorhídrico producido mediante la formación de la sal de amonio cuaternaria. Una solución del cloruro de ácido en acetona se agregó gota a gota sobre una solución de EG y trietilamina en acetona y se mantuvo a temperatura ambiente con atmósfera de nitrógeno durante 24 horas. Se filtró el cloruro de trietilamonio formado en la reacción como sólido blanco, se eliminó la acetona por evaporación y se secó bajo vacío. La reacción no se pudo realizar en una sola etapa debido a que el cloruro de tionilo reacciona con la amina terciaria. Esta ruta sintética condujo a mezclas de diéster y monoéster de DAT y cloruro de trietilamonio difíciles de separar y con un bajo rendimiento.

Finalmente, se empleó el método de esterificación de Fischer [9,22] que permitió la esterificación de los grupos ácido carboxílico de DAT con los grupos hidroxilo de

EG, en relación molar [DAT:EG] de [2:1]. La síntesis del diéster-difenol se llevó a cabo en reflujo de tolueno (10 % p/DAT/v) a 130°C, en presencia de ácido p-TsOH (1 % p/pDAT) como catalizador (**Esquema 4.3**). El equilibrio de la reacción se desplazó hacia los productos, atrapando el agua producida por destilación azeotrópica mediante el empleo de un Dean-Stark (**Figura 4.1**).



Esquema 4.3: Síntesis de extendedor de cadena diéster-difenol.



Figura 4.1: Síntesis de extendedor de cadena diéster-difenol.

Luego de 6 horas de reacción, se dejó la mezcla de reacción 12 horas a temperatura ambiente. El tolueno se eliminó por destilación a 50 °C a presión reducida (10 torr, T_{cb} tolueno = 110,6 °C). El producto obtenido (insoluble en agua) se lavó dos

veces con 50 ml de agua destilada a 50 °C durante 40 minutos, para eliminar trazas de solvente y reactivos (DAT y EG) que permanecieran sin reaccionar. Luego se enfrió la mezcla a 2 °C durante 12 horas, se filtró, secó al vacío y pulverizó. Se aplicó el mismo procedimiento entre lavados. El rendimiento obtenido fue de 67 %.

4.2.3 Métodos de caracterización

Se emplearon los siguientes métodos de caracterización para los productos sintetizados:

4.2.3.1 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H , ^{13}C y ^1H - ^{13}C HSQC NMR)

Los estudios mediante espectroscopía de ^1H , ^{13}C y correlación heteronuclear de ^1H - ^{13}C HSQC NMR permitieron la elucidación de la estructura química de los extendedores de cadena sintetizados. Las determinaciones se efectuaron en un espectrómetro de NMR Bruker AM-500 de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (UBA). En todos los casos se utilizó como solvente dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6).

4.2.3.2 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)

Se empleó un espectrómetro FTIR Mattson Genesis II. Los espectros se obtuvieron a temperatura ambiente realizando 64 barridos con una resolución de 2 cm^{-1} . Las muestras líquidas se estudiaron colocando alícuotas entre cristales de NaCl, mientras que las muestras sólidas se analizaron a partir de discos obtenidos empleando KBr.

Los análisis efectuados permitieron determinar tiempos finales de reacción y la presencia de grupos funcionales e interacciones intermoleculares puente de hidrógeno, con el objeto de dilucidar las estructuras moleculares de los extendedores de cadena.

4.2.3.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La determinación de propiedades térmicas de los productos sintetizados (temperatura y entalpía de fusión) se efectuó por DSC. Los ensayos se llevaron a cabo

en un calorímetro Shimadzu, empleando una velocidad de barrido de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, desde temperatura ambiente hasta $250\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.3.4 Solubilidad

Se estudió la solubilidad de reactivos y productos sintetizados, con el objeto de elegir los solventes adecuados para llevar a cabo procesos de síntesis y pasos de purificación. Se emplearon DMAc, DMSO, THF, éter etílico y agua destilada.

4.2.3.5 Modelado de la conformación molecular de A-L-A

La conformación molecular de A-L-A se modeló en fase gaseosa mediante la técnica semiempírica PM3 (Modelo Paramétrico 3) y la estructura electrónica se determinó empleando un método DFT (Teoría de Funcionales de Densidad), el B3LYP, basado en el funcional híbrido de tres parámetros de Becke con la base 6-31G**, implementados en Gaussian 03. La visualización de los orbitales moleculares se llevó a cabo mediante el programa Gaussview.

Este trabajo se realizó con la colaboración del Laboratorio de Biomateriales de la Universidad Federal de Itajubá (UNIFEI), Minas Gerais y la Universidad de São Paulo (USP-IPEN), Brasil.

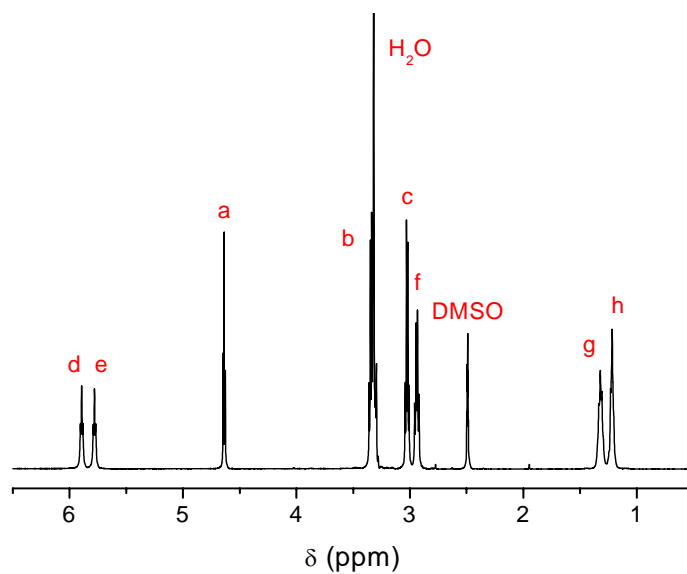
4.3 Resultados y Discusión

4.3.1 Caracterización del extendedor de cadena A-H-A

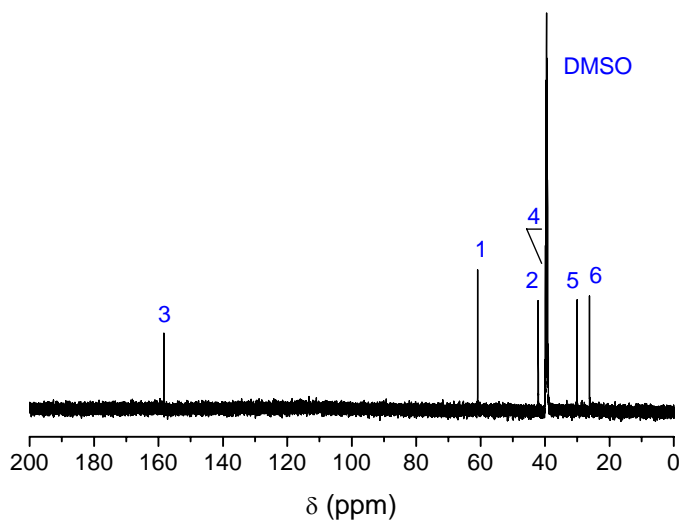
Los grupos amino reaccionan con los grupos isocianato en ausencia de catalizador, mientras que los grupos hidroxilo no reaccionan en estas condiciones. La reactividad de una amina primaria frente a un isocianato es mil veces mayor que la de un alcohol primario, en una reacción llevada a cabo a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin catalizador [23]. Esta diferencia de reactividad permite la síntesis de diurea-dioles a partir de hidroxilaminas y diisocianatos, sin reacción de polimerización.

4.3.1.1 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H , ^{13}C y ^1H - ^{13}C HSQC NMR)

La estructura química de A-H-A (**Esquema 4.1**) se confirmó mediante espectroscopía de NMR de ^1H , ^{13}C y ^1H - ^{13}C HSQC. Este compuesto es un diol de estructura simétrica y lineal con dos grupos urea. Su masa molar es de 290,36 Da.



a)



b)

Figura 4.2: Espectros de: a) ^1H NMR y b) ^{13}C NMR de A-H-A.

Las señales del espectro de ^1H NMR (**Figura 4.2a**) del producto obtenido se asignaron por comparación con las señales de HDI (espectro no mostrado). La simulación realizada con el programa ACD/HNMR (Advanced Chemistry Development Inc.) mostró una coincidencia completa con la asignación propuesta. Por otra parte, las señales del espectro de ^{13}C NMR (**Figura 4.2b**) se asignaron a partir de los espectros de ^1H NMR y de ^1H - ^{13}C HSQC NMR (**Figura 4.3**) y se simularon del mismo modo. Las asignaciones correspondientes a las señales de los espectros se muestran en el **Esquema 4.4**.

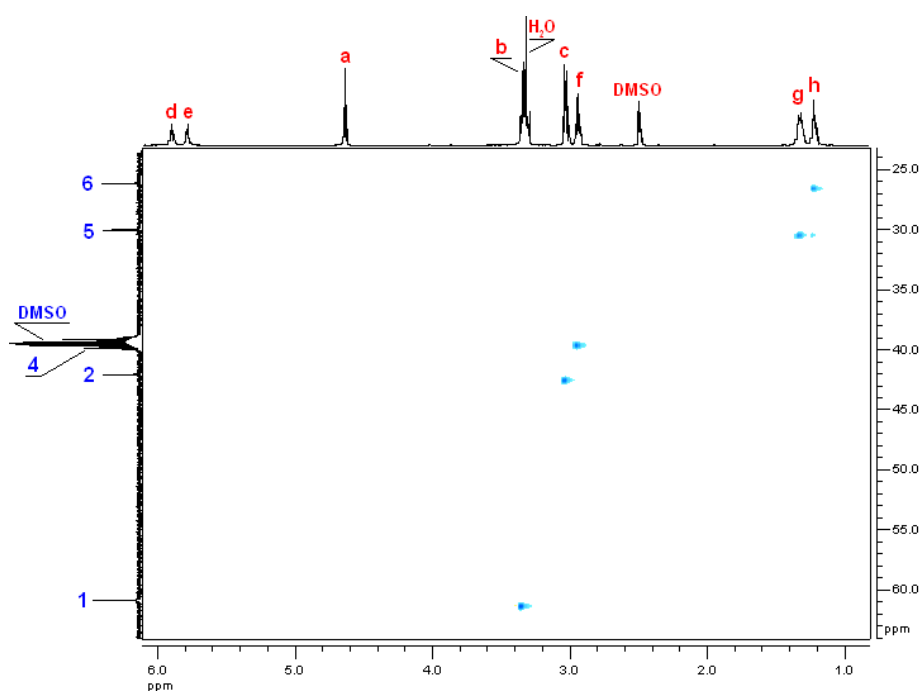
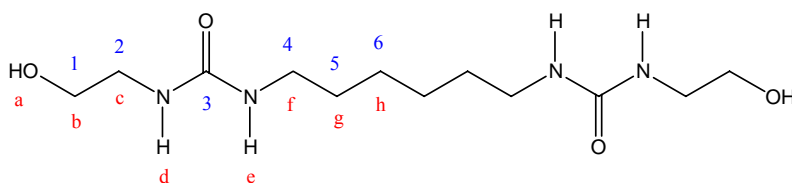


Figura 4.3: Espectro ^1H - ^{13}C HSQC NMR de A-H-A.



Esquema 4.4: Estructura química de A-H-A mostrando las asignaciones de ^1H (letras) y ^{13}C (números) en los espectros de NMR.

4.3.1.2 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)

El espectro de infrarrojo de A-H-A (**Figura 4.4**) mostró las siguientes bandas de absorción: 3332 cm^{-1} (ν N-H enlazado por puente de hidrógeno), $3500\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ (ν O-H en alcohol primario – solapado con banda N-H), 2934 cm^{-1} (ν_a C-H en CH_2) y 2857 cm^{-1} (ν_s C-H en CH_2), 1619 cm^{-1} (ν C=O en urea amida I enlazado por puente de hidrógeno), 1588 cm^{-1} (ν C-N y δ N-H en urea amida II), 1464 cm^{-1} (δ C-H en CH_2), 1259 cm^{-1} (ν C-N y δ N-H en urea amida III) y 1052 cm^{-1} (δ C-O en alcohol primario). No se observó la banda a 3515 cm^{-1} (ν N-H libre). Por lo tanto, se puede afirmar que en A-H-A todos los grupos N-H se encuentran unidos por puente de hidrógeno. Esto se puede atribuir a la simetría de la estructura molecular del extendedor.

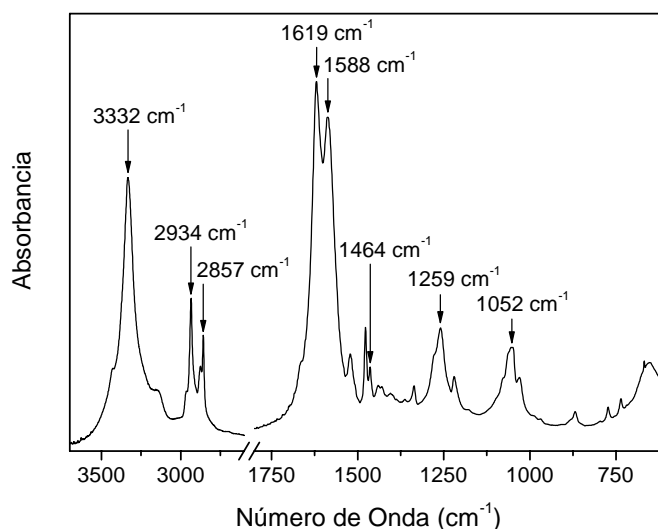


Figura 4.4: Espectro infrarrojo de A-H-A.

4.3.1.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En el termograma de la muestra (**Figura 4.5**) se observó un pico endotérmico que presenta un máximo en $193,6\text{ °C}$ ($\Delta H_m = 210\text{ J.g}^{-1}$), asignado a la fusión del extendedor. Los elevados valores de temperatura y entalpía de fusión se deben a la presencia de dos grupos urea en su estructura, su simetría y la presencia de un número par de grupos metileno, características que favorecen la formación de enlaces puente de hidrógeno, como se observó en el espectro de infrarrojo de la muestra (**Figura 4.4**).

Después de un enfriamiento controlado a $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ y la realización de un segundo barrido, no se observó la aparición de la endoterma de fusión. Por lo tanto, el diol A-H-A no es capaz de cristalizar nuevamente ya sea durante la etapa de enfriamiento o durante el barrido posterior.

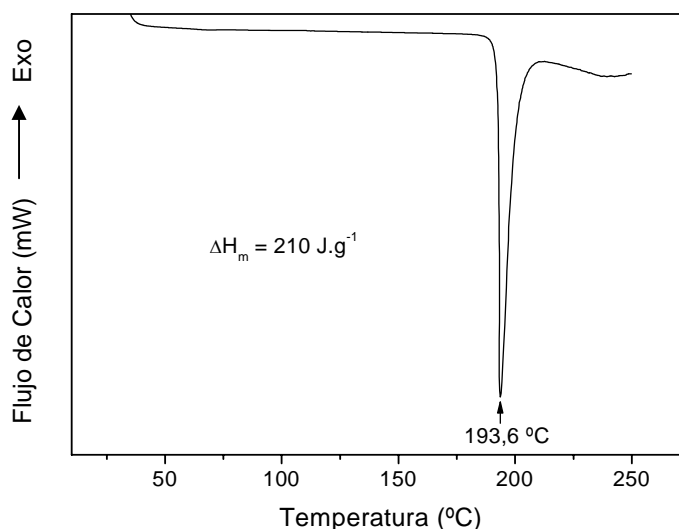


Figura 4.5: Termograma del compuesto A-H-A.

4.3.1.4 Solubilidad

El extendedor de cadena A-H-A es soluble en DMSO, soluble en DMAc y H_2O en caliente, y ligeramente soluble en THF en caliente.

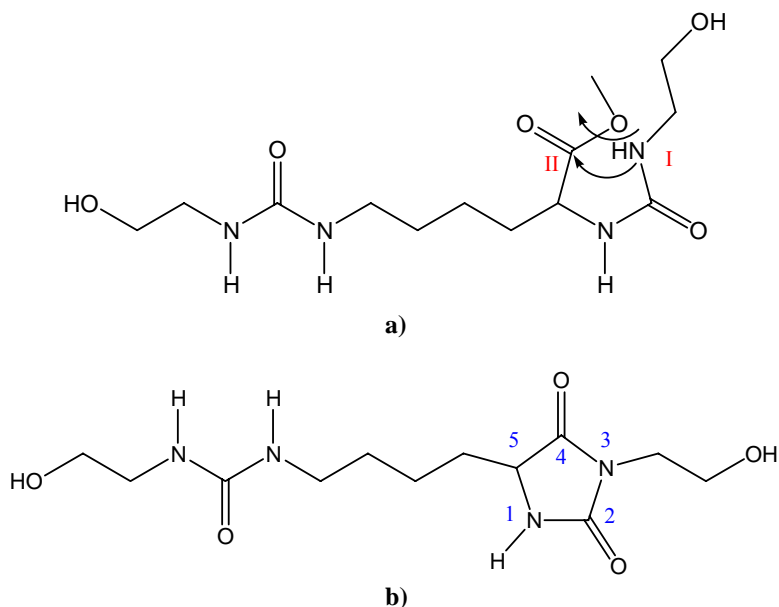
4.3.2 Caracterización del extendedor de cadena A-L-A

4.3.2.1 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H , ^{13}C y ^1H - ^{13}C HSQC NMR)

Las señales de los espectros de NMR de ^1H y ^{13}C obtenidos no concordaron con los resultados esperados para la estructura propuesta. El planteo de estructuras diferentes y la simulación de espectros con ACD/HNMR permitió dilucidar la estructura molecular correcta de A-L-A.

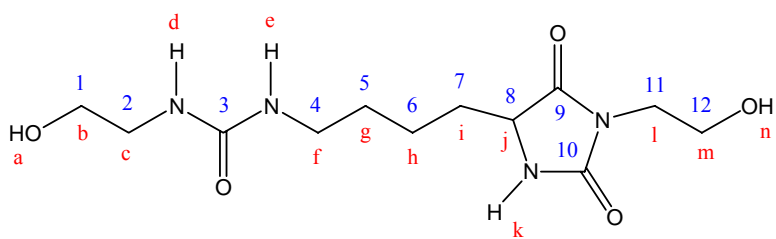
En la reacción de los grupos amino de AE con los grupos isocianato de LDI se espera la formación de un compuesto diol con dos grupos urea (**Esquema 4.5a**). Sin

embargo, una reacción de aminólisis intramolecular, dada por el ataque nucleofílico del nitrógeno I al carbono carbonílico II, condujo a la formación de un compuesto con un grupo urea y un ciclo de hidantoína 3,5-disustituida (**Esquema 4.5b**).

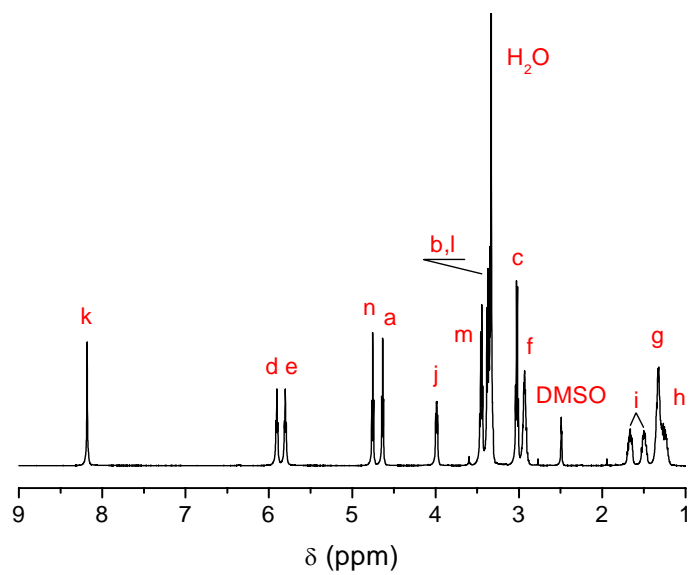


Esquema 4.5: a) Estructura química del intermediario del diol A-L-A; b) Estructura química del compuesto diurea-diol A-L-A (confirmada espectroscópicamente).

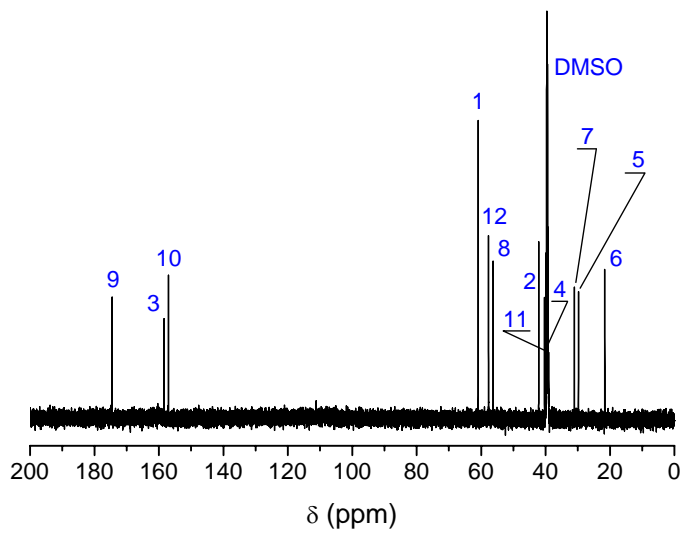
A partir de los espectros de ^1H NMR de LDI y A-H-A y con la simulación de espectros, se pudieron asignar las señales del espectro de ^1H NMR del compuesto obtenido (**Figura 4.6a**). Por otra parte, las señales del espectro de ^{13}C NMR del compuesto (**Figura 4.6b**) se asignaron a partir de sus espectros de ^1H NMR y de ^1H - ^{13}C HSQC NMR (**Figura 4.7**). De este modo, se dilucidó la estructura molecular correcta del compuesto A-L-A (**Esquema 4.5b**), cuyas asignaciones se muestran en el **Esquema 4.6**.



Esquema 4.6: Estructura química de A-L-A mostrando la asignación de ^1H (letras) y ^{13}C (números) en los espectros de NMR.



a)



b)

Figura 4.6: Espectros de: a) ^1H NMR y b) ^{13}C NMR de A-L-A.

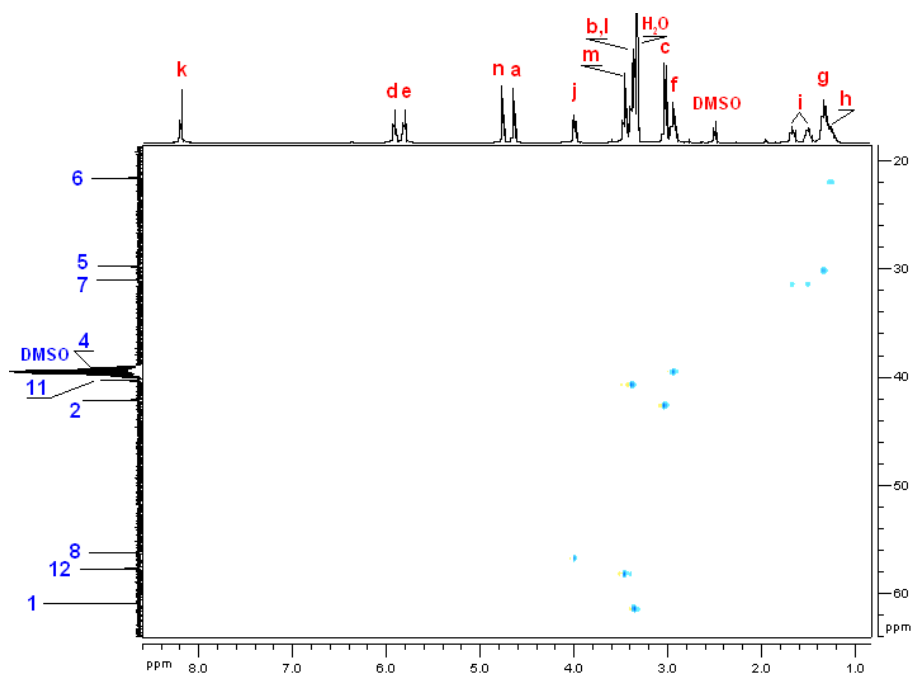
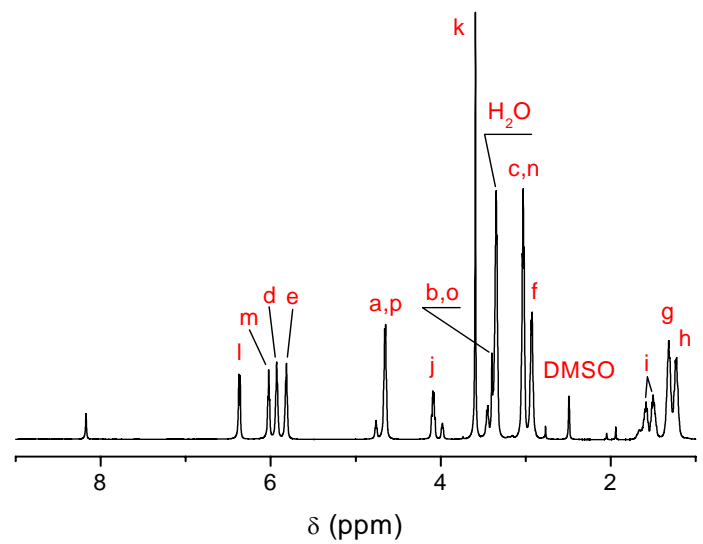


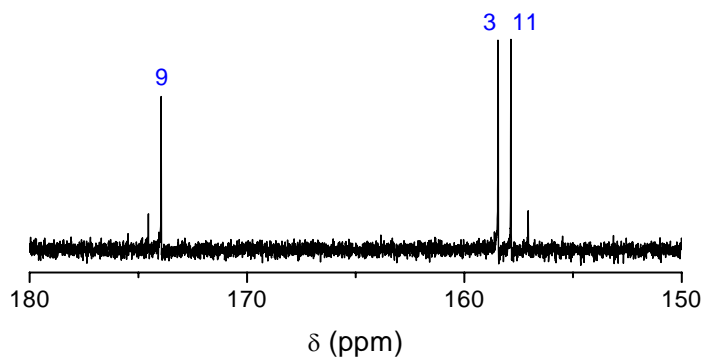
Figura 4.7: Espectro ^1H - ^{13}C HSQC NMR de A-L-A.

El compuesto A-L-A posee una masa molar de 302,33 Da, presenta una estructura asimétrica, un grupo urea y un ciclo de hidantoína sustituido en el N3 y en el C5. Existen compuestos derivados de hidantoína implicados en numerosas actividades biológicas, tales como inhibición de metaloproteínas y propiedades antimicrobiales. El efecto inhibitorio de enzimas está correlacionado con la disposición espacial de grupos funcionales en el anillo con capacidad de formar puentes de hidrógeno [24]. Sin embargo, los ensayos de actividad antimicrobial de A-L-A contra los microorganismos *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* resultaron negativos (resultados no mostrados).

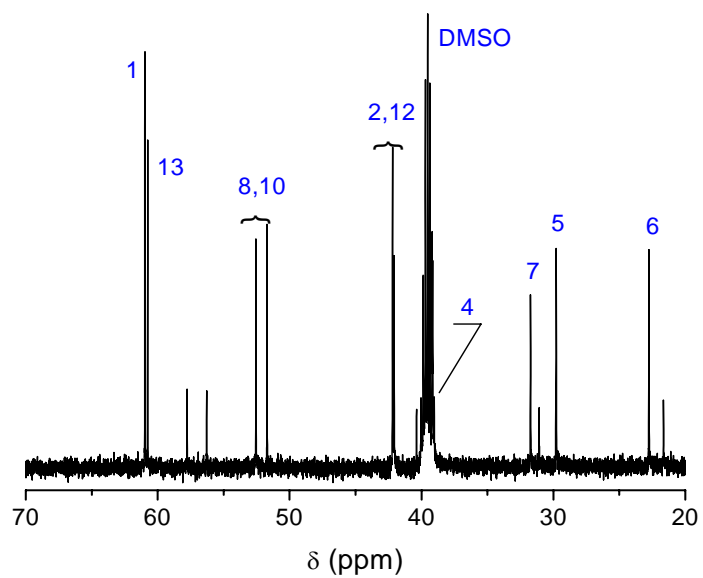
Cuando el producto de la reacción de AE con LDI se precipitó lentamente sobre THF en baño de hielo en lugar de destilar a presión reducida la DMAc, se logró obtener el compuesto diurea (**Esquema 4.7**) impurificado con el derivado de hidantoína, como se determinó a partir de los espectros de ^1H y ^{13}C NMR (**Figura 4.8**). Este resultado indica que un ligero calentamiento del compuesto diurea durante la destilación al vacío es suficiente para que ocurra la reacción de aminólisis intramolecular que produce el derivado cíclico.



a)

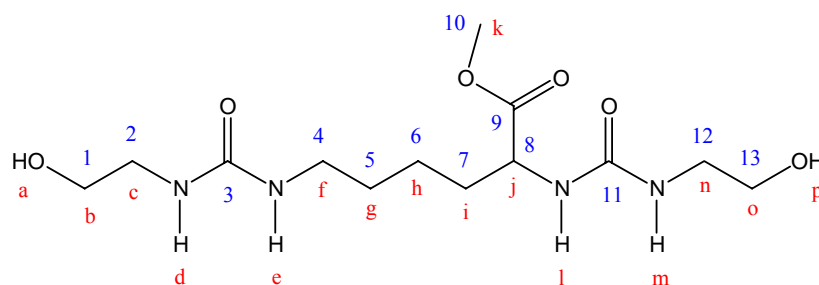


b)



b)

Figura 4.8: Espectros de: a) ^1H NMR y b) ^{13}C NMR del compuesto intermediario diurea.



Esquema 4.7: Estructura química del compuesto intermediario diureta, mostrando la asignación de ^1H (letras) y ^{13}C (números) en los espectros de NMR.

4.3.2.2 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)

El espectro infrarrojo de A-L-A (**Figura 4.9**) mostró las siguientes señales de absorción: 3515 cm^{-1} ($\nu\text{N-H}$ libre), 3350 y 3316 cm^{-1} ($\nu\text{N-H}$ enlazado por puente de hidrógeno), $3500\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ ($\nu\text{O-H}$ en alcohol primario – solapado con banda N-H), 2944 cm^{-1} ($\nu_{\text{a}}\text{C-H}$ en CH_2) y 2861 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}\text{C-H}$ en CH_2), 1784 cm^{-1} y 1708 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$ en hidantoína), ausencia de banda a 1743 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$ en éster de LDI), 1622 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$ en urea amida I enlazado por puente de hidrógeno), 1586 cm^{-1} ($\nu\text{C-N}$ y $\delta\text{N-H}$ en urea amida II), 1462 cm^{-1} ($\delta\text{C-H}$ en CH_2), 1251 cm^{-1} ($\nu\text{C-N}$ y $\delta\text{N-H}$ en urea amida III) y 1055 cm^{-1} ($\delta\text{C-O}$ en alcohol primario).

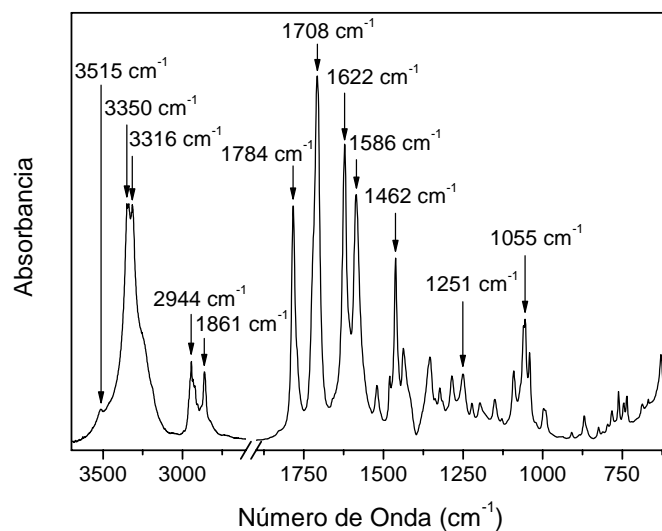


Figura 4.9: Espectro infrarrojo de A-L-A.

Este espectro permite confirmar la ausencia del grupo éster de LDI y la presencia del anillo de hidantoína, en concordancia con los resultados obtenidos mediante espectroscopía de NMR. En este caso, a diferencia del extensor A-H-A, no todos los grupos N-H se encuentran enlazados por puente de hidrógeno, lo cual puede atribuirse a la estructura asimétrica del diol.

4.3.2.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En el termograma de la **Figura 4.10** se observó un pico endotérmico a 118,8 °C ($\Delta H = 150 \text{ J.g}^{-1}$), asignado a la fusión del diol. En este caso, la temperatura y entalpía de fusión son menores que las encontradas para A-H-A, lo cual puede atribuirse a la presencia de un único grupo funcional urea en su estructura, su asimetría y un número impar de grupos metileno, que dificultan una completa interacción de los grupos urea por puentes de hidrógeno.

Luego de un enfriamiento controlado a 5 °C.min^{-1} , y la realización de un segundo barrido no se observó la aparición de la endoterma de fusión. Por lo tanto, el diol A-L-A es un compuesto cristalino que presenta interacciones intermoleculares relativamente fuertes, pero que no es capaz de cristalizar nuevamente, ya sea durante la etapa de enfriamiento o durante el barrido posterior.

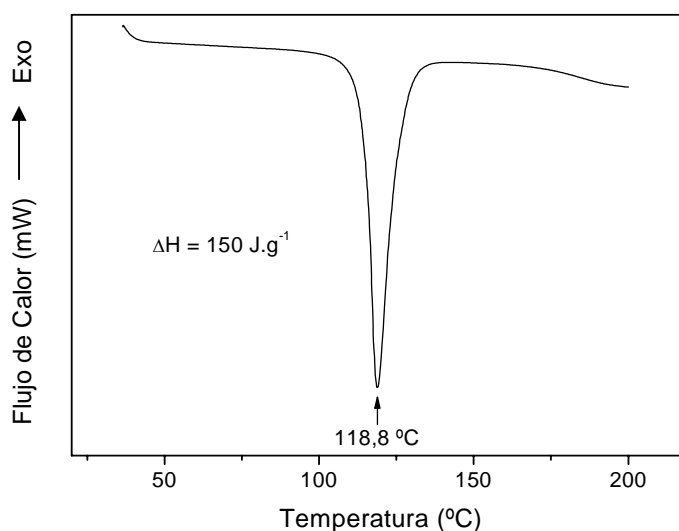


Figura 4.10: Termograma del compuesto A-L-A.

4.3.2.4 Solubilidad

El extensor de cadena es soluble en DMAc, DMSO y H₂O, y ligeramente soluble en THF en caliente. La solubilidad de A-L-A resultó mayor que la de A-H-A, lo que se puede relacionar con la mayor asociación por puente de hidrógeno que posee A-H-A.

4.3.2.5 Modelado de la conformación molecular de A-L-A

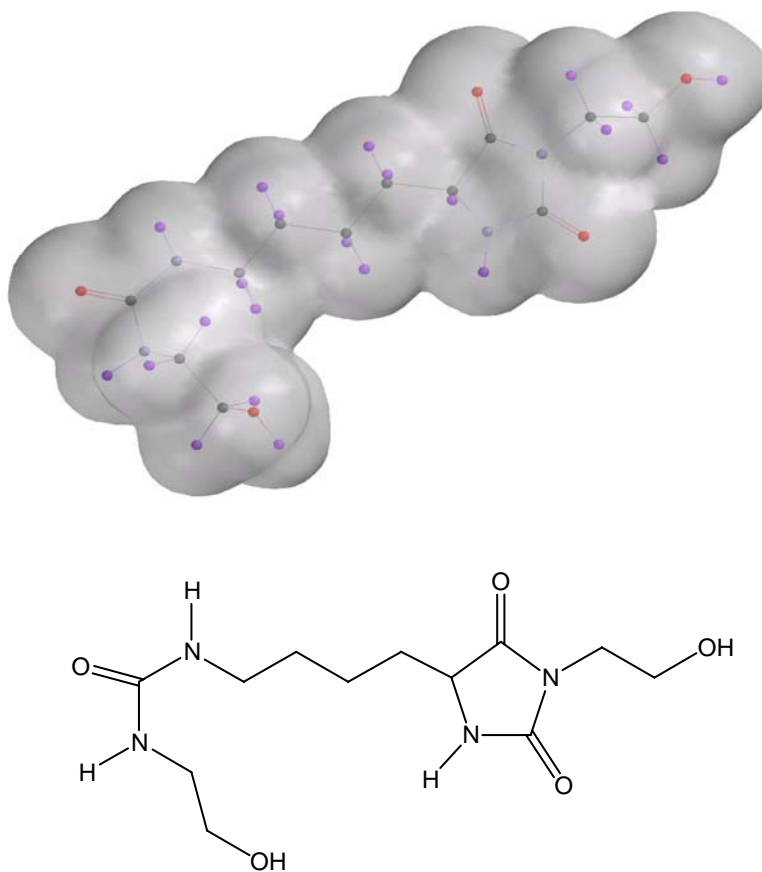


Figura 4.11: Conformación molecular del compuesto A-L-A.

El modelado de la conformación molecular de A-L-A mostró que el compuesto presenta una estructura lineal angular, mientras que el anillo de hidantoína posee una estructura planar (**Figura 4.11**). El análisis de la conformación electrónica indica que existe un desplazamiento del orbital molecular ocupado de mayor energía (HOMO) de la cadena alquílica lateral hacia el orbital molecular desocupado de menor energía

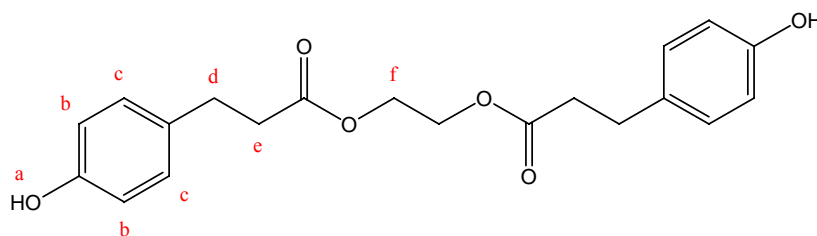
(LUMO) del anillo. Así, el anillo de hidantoína presenta una densidad electrónica muy elevada, lo que permitiría la sustitución del hidrógeno enlazado al nitrógeno para la introducción de principios activos.

4.3.3 Caracterización del extensor de cadena D-E-D

Los diéster-difenoles derivados de DAT son compuestos de alto interés para su empleo como extendedores de cadena de SPU biorreabsorbibles dado que además de poseer anillos aromáticos, estructura simétrica y uniones éster hidrolizables, presentan la ventaja de ser derivados del aminoácido tirosina.

4.3.3.1 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H NMR)

La estructura química del compuesto (**Esquema 4.8**) se confirmó mediante espectroscopía de ^1H NMR. Este compuesto, de masa molar 358,39 Da, presenta una estructura simétrica y lineal. Las señales del espectro de ^1H NMR del producto obtenido (**Figura 4.12**) se asignaron mediante comparación con el espectro de DAT (espectro no mostrado) y posteriormente simuladas con ACD/HNMR. Las asignaciones correspondientes a las señales del espectro se muestran en el **Esquema 4.8**.



Esquema 4.8: Estructura química del compuesto diéster-difenol D-E-D.

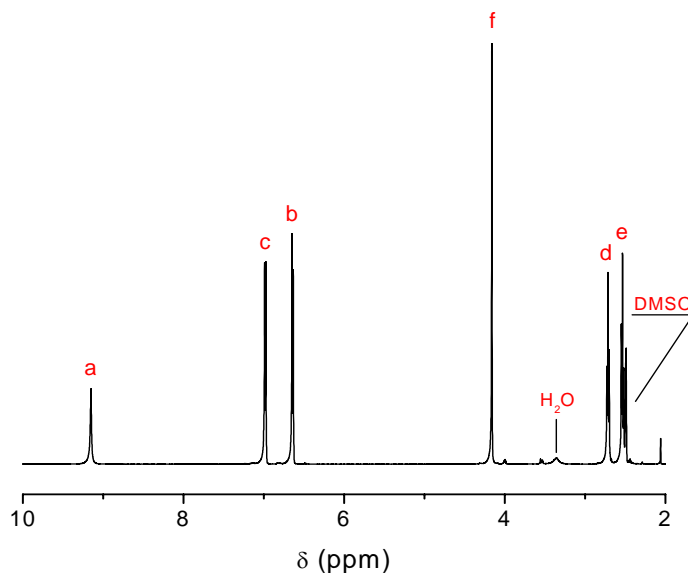


Figura 4.12: Espectro ^1H NMR de D-E-D.

4.3.3.2 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)

El espectro infrarrojo de D-E-D (**Figura 4.13**) mostró las siguientes bandas de absorción: 3371 cm^{-1} ($\nu\text{O-H}$ fenólico), 2957 cm^{-1} y 2872 cm^{-1} ($\nu_{\text{a}}\text{C-H}$ y $\nu_{\text{s}}\text{C-H}$ en CH_2 , respectivamente), 1712 cm^{-1} ($\nu\text{C=O}$ en éster), 1518 cm^{-1} ($\delta\text{C-H}$ en benceno 1,4 disustituido), 1231 cm^{-1} ($\delta\text{O-H}$ + $\nu\text{C-O}$ en fenol), 1178 cm^{-1} ($\nu\text{C-O-C}$ en éster), 833 cm^{-1} ($\gamma\text{C-H}$ en benceno 1,4 disustituido).

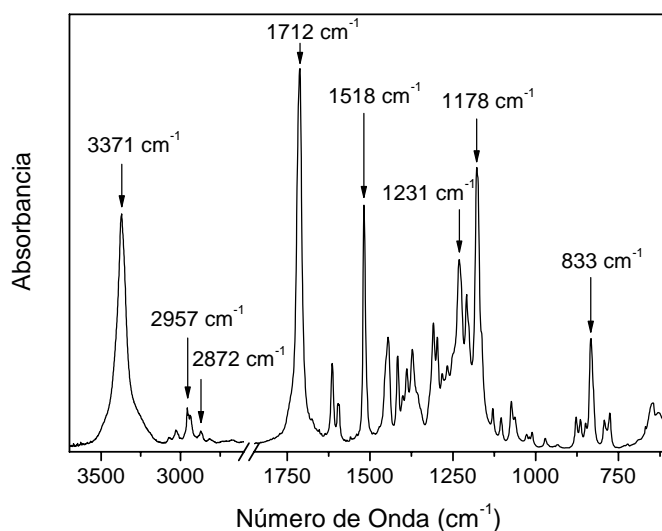


Figura 4.13: Espectro FTIR del diéster-difenol D-E-D.

4.3.3.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En el termograma de la muestra se observó un pico endotérmico a 120,9 °C ($\Delta H = 140 \text{ J.g}^{-1}$), asignado a la fusión del diéster (**Figura 4.14**). Los valores observados de temperatura y entalpía de fusión fueron muy próximos a los obtenidos para el compuesto A-L-A. Al igual que en los extendedores A-H-A y A-LA, no se observó la endoterma de fusión durante el segundo barrido después de un enfriamiento controlado a 5 °C.min^{-1} .

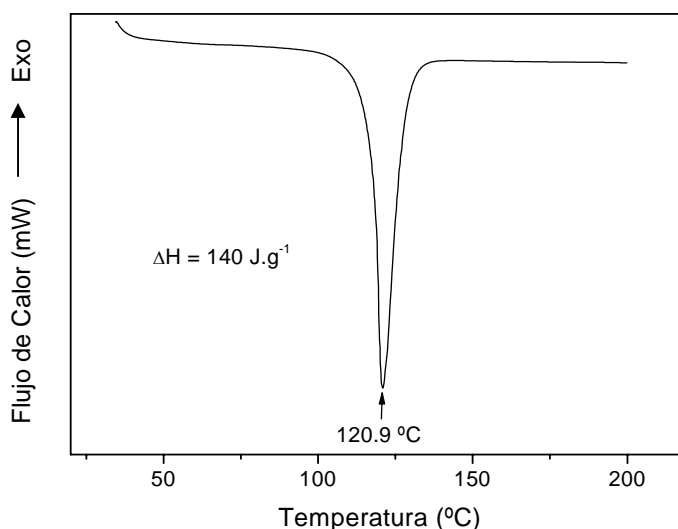


Figura 4.14: Termograma del compuesto D-E-D.

4.3.3.4 Solubilidad

El extendedor de cadena es soluble en éter etílico, DMAc y DMSO, e insoluble en H_2O .

4.4 Conclusiones parciales

Se sintetizaron y caracterizaron satisfactoriamente dos nuevos extendedores de cadena alifáticos diol con grupos urea, y un extendedor de cadena aromático difenol con grupos éster. Los compuestos resultaron cristalinos y presentaron temperaturas y entalpías de fusión elevadas, consistentes con la presencia de fuertes interacciones intermoleculares que podrían favorecer la separación de fases en poliuretanos. Además,

los extendedores son solubles en DMAc, lo cual resulta importante debido a que éste es un solvente habitualmente empleado en la síntesis de poliuretanos.

4.5 Referencias

- [1] Oertel G. Polyurethane handbook, Berlin: Hanser Publishers, p. 34, **1990**.
- [2] Guan J., Sacks M.S., Beckman E.J., Wagner W.R. Synthesis, characterization, and cytocompatibility of elastomeric, biodegradable poly(ester–urethane)ureas based on poly(ϵ -caprolactone) and putrescine. *J Biomed Mater Res*, 61 (3): 493–503, **2002**.
- [3] de Groot J.H., de Vrijer R., Wildeboer B.S., Spaans C.J., Pennings A.J. New biomedical polyurethane ureas with high tear strengths. *Polym Bull*, 38 (2): 211–218, **1997**.
- [4] Guan J., Fujimoto K.L., Sacks M.S., Wagner W.R. Preparation and characterization of highly porous biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications. *Biomaterials*, 26 (18): 3961–3971, **2005**.
- [5] Spaans C.J., de Groot J.H., Dekens F.G., Pennings A.J. High molecular weight polyurethanes and a polyurethane urea based on 1,4-butadiisocyanate. *Polym Bull*, 41 (2): 131–138, **1998**.
- [6] Marcos-Fernández A., Abraham G.A., Valentín J.L., San Román J. Synthesis and characterization of biodegradable non-toxic poly(ester–urethane–urea)s based on poly(ϵ -caprolactone) and amino acid derivatives. *Polymer*, 47 (3): 785–798, **2006**.
- [7] Abraham G.A., Marcos-Fernández A., San Román J. Bioreabsorbable poly(ester ether urethane)s from L-lysine diisocyanate and triblock copolymers with different hydrophilic character. *J Biomed Mater Res Part A*, 76A (4): 729–736, **2006**.
- [8] Skarja G.A., Woodhouse K.A. Structure–property relationships of degradable polyurethane elastomers containing an amino acid-based chain extender. *J Appl Polym Sci*, 75 (12): 1522–1534, **2000**.
- [9] Skarja G.A., Woodhouse K.A. Synthesis and characterization of degradable polyurethane elastomers containing an amino acid-based chain extender. *J Biomater Sci Polym Ed*, 9 (3): 271–295, **1998**.

- [10] Heijkants R.C.J.C., van Calck R.V., de Groot J.H., Pennings A.J., Schouten A.J., van Tienen T.G., Ramrattan N., Buma P., Veth R.P.H. Design, synthesis and properties of a degradable polyurethane scaffold for meniscus regeneration. *J Mater Sci Mater Med*, 15 (4): 423–427, **2004**.
- [11] Heijkants R.G.J.C., van Calck R.V., van Tienen T.G., de Groot J.H., Buma P., Pennings A.J., Veth R.P.H., Schouten A.J.. Uncatalyzed synthesis, thermal and mechanical properties of polyurethanes based on poly(ϵ -caprolactone) and 1,4-butane diisocyanate with uniform hard segment. *Biomaterials*, 26 (20): 4219–4228, **2005**.
- [12] Gorna K., Gogolewski S. *In vitro* degradation of novel medical biodegradable aliphatic polyurethanes based on ϵ -caprolactone and Pluronics with various hydrophilicities. *Polym Deg Stab*, 75 (1): 113–122, **2002**.
- [13] de Groot J.H., de Vrijer R., Pennings A.J., Klompaker J., Veth R.P.H., Jansen H.W.B. Use of porous polyurethanes for meniscal reconstruction and meniscal prostheses. *Biomaterials*, 17 (2): 163–173, **1996**.
- [14] Shau M.D., Tseng S.J., Yang T.F., Cherng J.Y., Chin W.K. Effect of molecular weight on the transfection efficiency of novel polyurethane as a biodegradable gene vector. *J Biomed Mater Res Part A*, 77A (4): 736–746, **2006**.
- [15] Takahara A., Hadano M., Yamaguchi T., Otsuka H., Kidoaki S., Matsuda T. Characterization of novel biodegradable segmented polyurethanes prepared from amino-acid based diisocyanate. *Macromol Symp*, 224: 207-217, **2005**.
- [16] Gorna K., Gogolewski S. Novel biodegradable polyurethanes for medical applications, en *Synthetic bioabsorbable polymers for implants* (Agrawal C.M., Parr J.E., Lin S.T. eds.), ASTM STP 1396, American Society for Testing and Materials, West Conshohocken (PA), 39–57, **2000**.
- [17] Spaans C.J., de Groot J.H., Belgraver V.W., Pennings A.J. A new biomedical polyurethane with a high modulus based on 1,4-butanediisocyanate and ϵ -caprolactone. *J Mater Sci Mater Med*, 9 (12): 675–678, **1998**.
- [18] Guelcher S.A., Gallagher K.M., Didier J.E., Klinedinst D.B., Doctor J.S., Goldstein A.S., Wilkes G.L., Beckman E.J., Hollinger J.O. Synthesis of biocompatible segmented

polyurethanes from aliphatic diisocyanates and diurea diol chain extenders. *Acta Biomater*, 1 (4): 471–484, **2005**.

[19] Kavlock K.D., Pechar T.W., Hollinger J.O., Guelcher S.A., Goldstein A.S. Synthesis and characterization of segmented poly(esterurethane urea) elastomers for bone tissue engineering. *Acta Biomater*, 3 (4): 475–484, **2007**.

[20] Basse Asplund J.O., Bowden T., Mathisen T., Hilborn J. Variable hard segment length in poly(urethane urea) through excess of diisocyanate and vapour phase addition of water. *Macromolecules*, 39 (2): 4380–4385, **2006**.

[21] Hooper K.A., Kohn J. Diphenolic Monomers Derived from the Natural Amino Acid α -L-Tyrosine: An Evaluation of Peptide Coupling Techniques. *J Bioact Compat Polym*, 10 (4): 327–340, **1995**.

[22] Skarja G.A., Woodhouse K.A. *In vitro* degradation and erosion of degradable, segmented polyurethanes containing an amino acid-based chain extender. *J Biomater Sci Polym Ed*, 12 (8): 851-873, **2001**.

[23] Szycher M. Szycher's handbook of polyurethanes. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, **1999**.

[24] SethuSancar K., Thennarasu S., Velmurugan D., Kim M.J. 5-[Acetamido(phenyl)methyl]-5-methylimidazolidine-2,4-dione. *Acta Cryst Section C*, 58 (12): 715–717, **2003**.

CAPÍTULO 5

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE POLI(ÉSTER URETANOS) Y POLI(ÉSTER URETANO UREAS) SEGMENTADOS

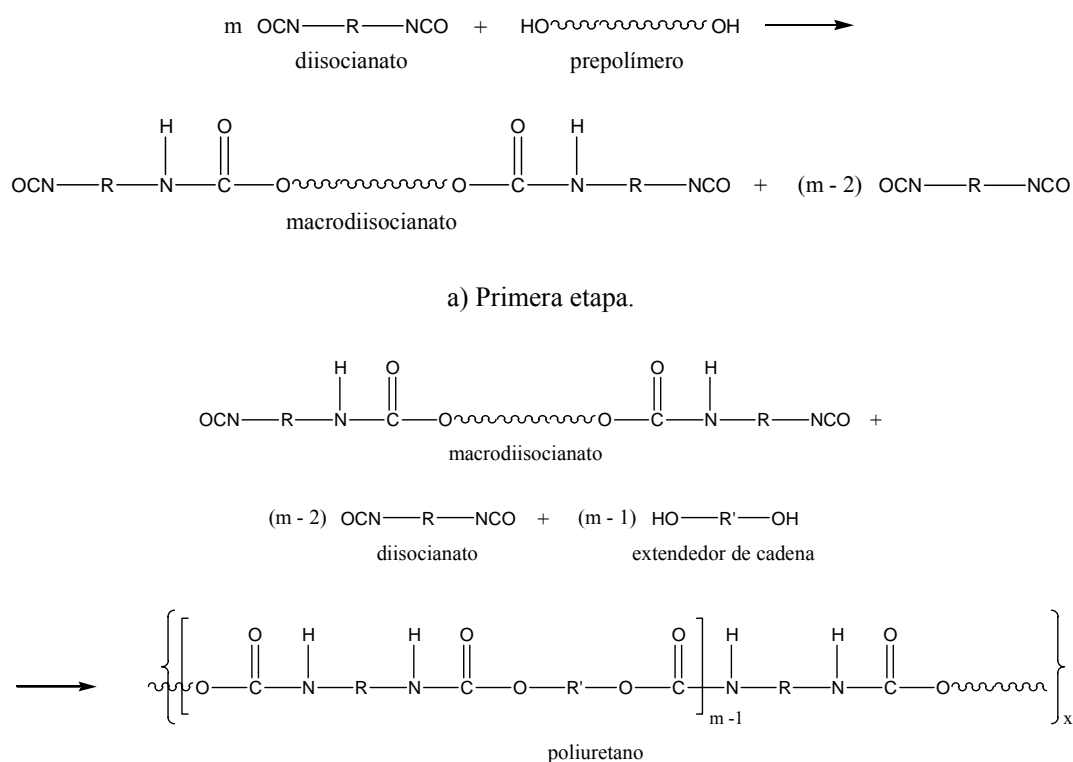
5.1 Introducción

5.1.1 Síntesis de poliuretanos

Los métodos de síntesis de poliuretanos se diferencian de acuerdo al medio en el cual se llevan a cabo las reacciones (en masa, en solución o en agua), el número de etapas (una o dos etapas) y finalmente el tipo de curado (sistemas de uno o dos componentes).

El método de una etapa, tanto en masa como en solución, involucra el mezclado simultáneo de todos los reactivos, y requiere el uso de catalizadores adecuados para compensar las diferencias en la reactividad. La reacción es altamente exotérmica y el calor total liberado incrementa considerablemente la temperatura del sistema, más aún cuando ésta se lleva a cabo en ausencia de solvente. Esta vía de síntesis es la forma más rápida, simple y económica para la obtención de poliuretanos, en particular materiales espumados flexibles. En general, las propiedades de los poliuretanos obtenidos por esta ruta sintética son inferiores a las de los poliuretanos lineales sintetizados por el método de dos etapas, que permite un mayor control de la reactividad, estructura, propiedades y procesabilidad [1]. El método del prepolímero o de dos etapas para la síntesis de poliuretanos segmentados lineales involucra la reacción de un macrodiol lineal con un ligero exceso de diisocianato para formar un macrodiisocianato, el cual normalmente es un líquido altamente viscoso o sólido de bajo punto de fusión. El paso siguiente consiste en la extensión de cadena por reacción con un compuesto difuncional (extendedor de cadena) para incrementar el peso molecular y promover la separación en microfases. Si la reacción se lleva a cabo en solución se tiene un mayor control de la reacción, mayor reproducibilidad y procesabilidad mediante diversas técnicas como por ejemplo colada de soluciones (*solution casting*), inmersión de piezas (*dipping*) o electrohilado (*electrospinning*). Entre las desventajas se encuentran el empleo de solventes orgánicos y la imposibilidad de procesamiento mediante extrusión o moldeo por inyección [2].

La secuencia de reacciones antes descrita se muestra en el **Esquema 5.1**:



b) Segunda Etapa (para el caso de reacción con un diol): “extensión de cadena” o “curado”.

Esquema 5.1: Síntesis de poliuretanos por el método de dos etapas.

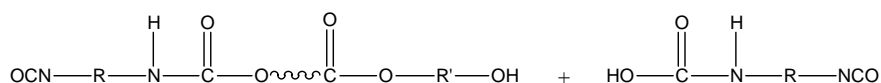
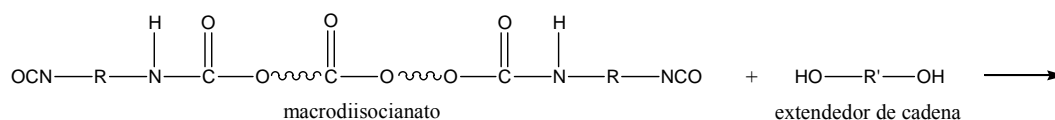
Debido a la naturaleza de la ruta sintética, el método de dos etapas produce inevitablemente una distribución estadística de longitudes de segmentos, tanto en la primera como en la segunda etapa, aunque ésta es más estrecha que en el método de una etapa. La **Figura 1.2a** muestra claramente segmentos duros conformados por varias unidades de isocianato y extendedor de cadena y segmentos blandos formados por multibloques de macrodiol.

En este capítulo se describe la síntesis de dos series de poli(éster uretanos) segmentados y su caracterización mediante viscosimetría capilar y espectroscopía de infrarrojo.

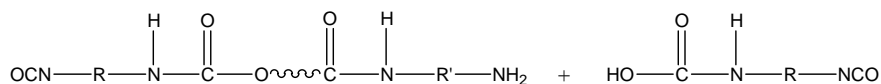
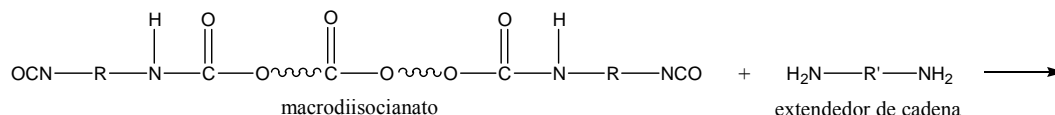
5.1.1.1 Reacciones secundarias

- Reacciones en las que participa el extendedor de cadena:

En la síntesis de poliuretanos por el método de dos etapas, la segunda etapa (reacción del macrodiisocianato con el extendedor de cadena) puede dar lugar a reacciones indeseadas. El extendedor de cadena, además de reaccionar con los grupos terminales isocianato, puede realizar un ataque nucleofílico a los grupos funcionales éster presentes en el macrodiisocianato. Esta reacción se denomina transesterificación o aminólisis dependiendo de si el extendedor de cadena posee grupos hidroxilo (**Esquema 5.2a**) o amino (**Esquema 5.2b**). Estas reacciones producen la disminución del peso molecular del poliuretano resultante [3].



a)

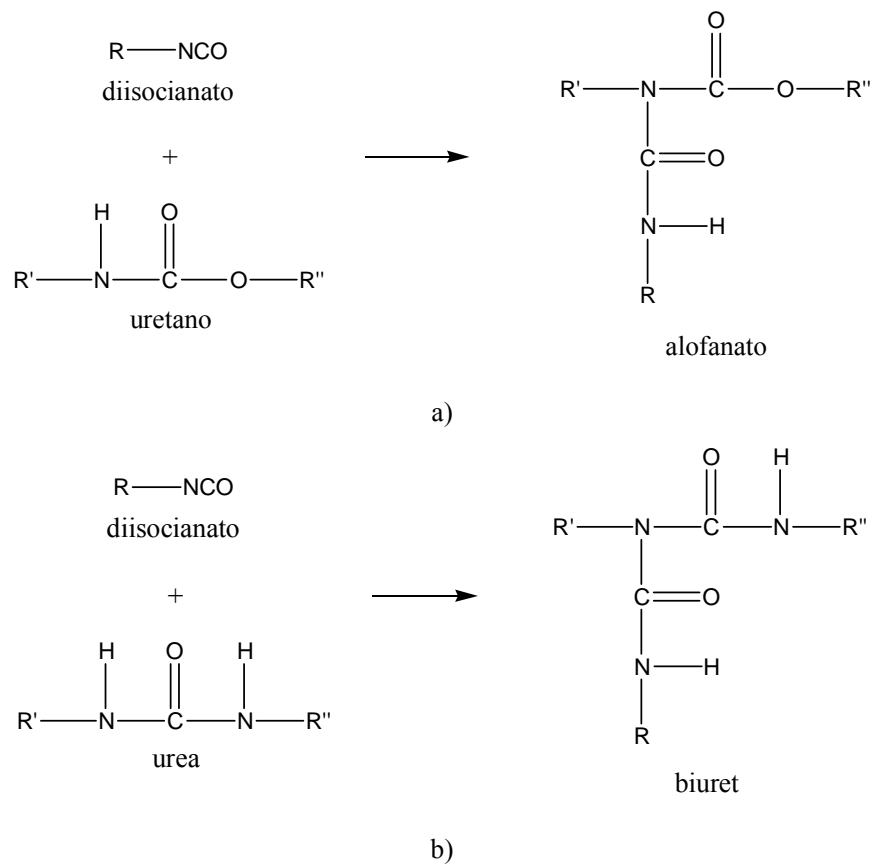


b)

Esquema 5.2: Reacciones secundarias debidas al extendedor de cadena: a) transesterificación y b) aminólisis.

- Reacciones en las que participa el grupo isocianato:

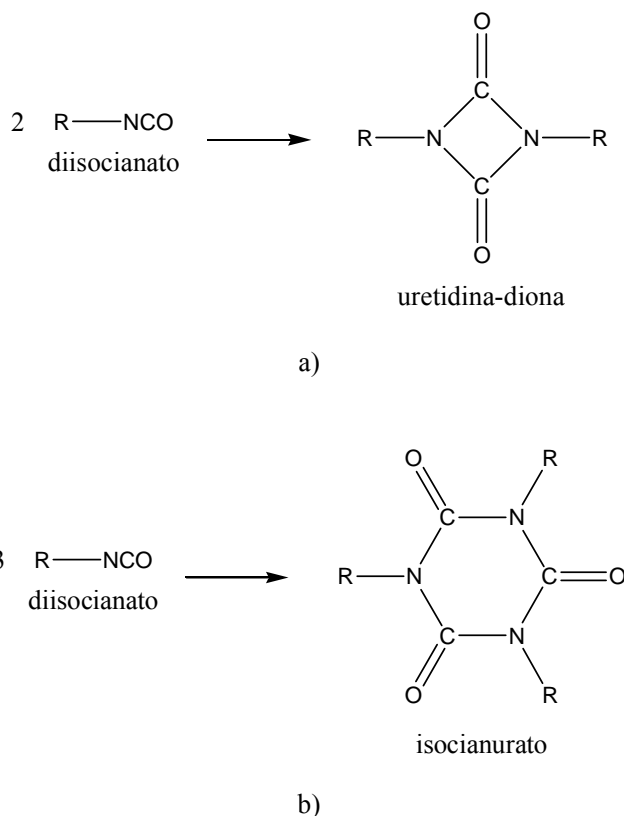
Entre las reacciones secundarias se encuentran también el ataque nucleofílico de grupos uretano y urea a grupos isocianato. Los productos de estas reacciones son los alofanatos (**Esquema 5.3a**) y los biurets (**Esquema 5.3b**):



Esquema 5.3: Reacciones secundarias en las que participa el grupo isocianato: a) formación de alofanatos, b) formación de biurets.

Estas reacciones requieren temperaturas elevadas, de alrededor de 100 °C en el caso de biurets y de 130 °C para los alofanatos, y un exceso de grupos isocianato [4]. Como consecuencia de estas reacciones se forman puntos de entrecruzamiento de las cadenas poliuretánicas.

Los grupos isocianato también pueden reaccionar consigo mismos para formar especies oligoméricas, como dímeros (uretina-dionas, **Esquema 5.4a**) y trímeros (isocianuratos, **Esquema 5.4b**).



Esquema 5.4: Reacciones de isocianatos. Formación de a) uretidina-dionas y b) isocianuratos.

La reacción de formación de dímeros puede ocurrir a temperatura ambiente, y es reversible a 150 °C, mientras que los poliisocianatos producidos por trimerización son estables hasta temperaturas más elevadas [5], debido a su mayor deslocalización electrónica.

5.1.2 Propiedades cohesivas

Las propiedades cohesivas de un polímero se encuentran en relación directa con su solubilidad en un líquido orgánico. Estas propiedades se expresan cuantitativamente en términos de energía cohesiva (E_{coh}), magnitud íntimamente relacionada con la energía interna. La energía cohesiva de una sustancia en estado condensado se define como el incremento de energía interna por mol de sustancia (ΔU) si se eliminan todas las fuerzas intermoleculares (Hildebrand, 1916) [6,7]. Scatchard introdujo el concepto de densidad de energía cohesiva como la energía cohesiva por unidad de volumen y posteriormente Hildebrand definió el parámetro de solubilidad (δ) como la raíz

cuadrada de la densidad de energía cohesiva, identificando el comportamiento de los solventes.

$$E_{coh} = \Delta U \quad \delta = \left(\frac{E_{coh}}{V} \right)^{1/2}$$

El parámetro de solubilidad, de manera conceptual, describe la fuerza atractiva entre las moléculas del material, y sus dimensiones son $(\text{cal.cm}^{-3})^{1/2}$, $(\text{J.cm}^{-3})^{1/2}$ o $\text{MPa}^{1/2}$ (siendo $1 (\text{cal.cm}^{-3})^{1/2} = 2,046 (\text{J.cm}^{-3})^{1/2} = 2,046 \text{MPa}^{1/2}$). El criterio termodinámico de solubilidad está basado en la energía libre de mezcla, ΔG_M . Dos sustancias son mutuamente solubles si ΔG_M es negativo. Por definición:

$$\Delta G_M = \Delta H_M - T \cdot \Delta S_M$$

donde ΔH_M y ΔS_M corresponden a la entalpía y entropía de mezcla por unidad de volumen, respectivamente. Como ΔS_M es generalmente positivo, hay un valor límite positivo para ΔH_M debajo del cual la disolución es posible. De acuerdo a Hildebrand, la entalpía de mezcla puede calcularse como:

$$\Delta H_M = \varphi_1 \cdot \varphi_2 \cdot (\delta_1 - \delta_2)^2$$

donde φ_1 y φ_2 corresponden a las fracciones en volumen de los componentes 1 (polímero) y 2 (solvente), y δ_1 y δ_2 son los parámetros de solubilidad de ambos componentes. Según esta última ecuación, la solubilidad de un polímero dado en un solvente se favorece si los parámetros de solubilidad del polímero (en estado amorfo a temperatura ambiente) y el solvente son iguales ($\Delta H_M = 0$ cuando $\delta_1 = \delta_2$) o su diferencia tan pequeña como sea posible. Esto está de acuerdo con la regla general de que la similitud química y estructural favorece la solubilidad. Sin embargo, el requerimiento de que los parámetros de interacción no deben diferir demasiado es insuficiente. La solubilidad mutua solamente ocurre si el grado de puente de hidrógeno es aproximadamente igual. Formalmente la energía cohesiva puede dividirse en tres componentes, correspondientes con los tres tipos de fuerzas de interacción:

$$E_{coh} = E_d + E_p + E_h$$

donde las contribuciones se deben a fuerzas dispersivas (d), polares (p) y por puente de hidrógeno (h). De la misma manera, el parámetro de solubilidad puede expresarse como:

$$\delta^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2$$

por lo que la entalpía de mezcla corresponde a:

$$\Delta H_M = \varphi_1 \cdot \varphi_2 \cdot [(\delta_{d,1} - \delta_{d,2})^2 + (\delta_{p,1} - \delta_{p,2})^2 + (\delta_{h,1} - \delta_{h,2})^2]$$

Los valores de los componentes del parámetro de solubilidad δ_d , δ_p y δ_h para solventes no usuales y para polímeros se pueden predecir mediante distintas aproximaciones que involucran métodos de contribuciones de grupos. En el método de Hoftzyer y Van Krevelen [2], estos componentes se calculan como:

$$\delta_d = \frac{\sum F_{di}}{V} \quad \delta_p = \frac{\sqrt{\sum F_{pi}^2}}{V} \quad \delta_h = \frac{\sqrt{\sum F_{hi}}}{V}$$

Por último, para predecir la solubilidad de un polímero en un líquido orgánico, la diferencia en los parámetros de solubilidad ($\Delta\delta$) debe ser menor o igual al 5 %:

$$\Delta\delta = [(\delta_{d,1} - \delta_{d,2})^2 + (\delta_{p,1} - \delta_{p,2})^2 + (\delta_{h,1} - \delta_{h,2})^2]$$

Los parámetros de solubilidad están relacionados con otras cantidades termodinámicas, como el coeficiente de actividad, la energía libre molar en exceso de mezcla y parámetro de interacción polímero-solvente (χ). De hecho, la cantidad $(\delta_1 - \delta_2)^2$ forma parte de la expresión de χ :

$$\chi_{1,2} \approx \frac{V_2}{RT} (\delta_1 - \delta_2)^2 + 0,34$$

La solubilidad de un polímero en un determinado solvente está determinada principalmente por su estructura química y su estado físico. Como se mencionó anteriormente, el concepto de parámetro de solubilidad, es aplicable solamente a polímeros amorfos. Los polímeros cristalinos son relativamente insolubles y a menudo se disuelven solamente a temperaturas ligeramente por debajo de sus puntos de fusión

($T > 0,9.T_m$). El polietileno y politetrafluoroetileno, polímeros altamente cristalinos, son insolubles en todos los solventes a temperatura ambiente. Por otra parte, algunos polímeros cristalinos con grupos enlazados fuertemente mediante interacciones tipo puente de hidrógeno pueden disolverse a temperatura ambiente en solventes puros o empleando soluciones con sales de litio. En estos casos, existen interacciones muy específicas entre el polímero y el solvente.

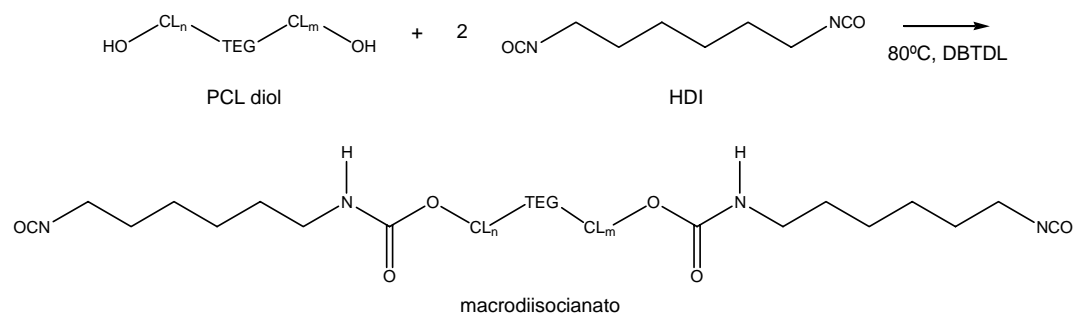
5.2 Materiales y Métodos

5.2.1 Materiales

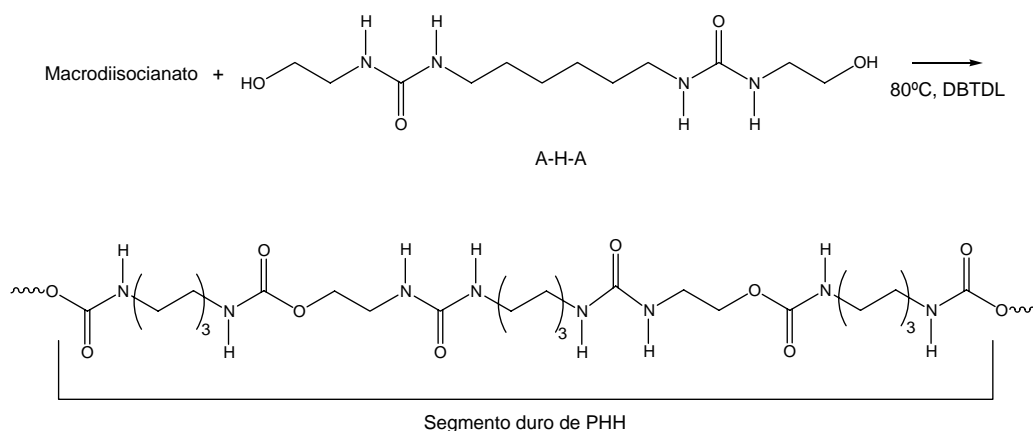
Se utilizaron PCL diol ($M_n = 2250$ Da, valor obtenido por titulación de grupos hidroxilo terminales), cuya síntesis y caracterización se detalló en el **Capítulo 3**, y los extendedores de cadena A-H-A y A-L-A (urea-diol) y D-E-D (diéster-difenol) sintetizados y caracterizados como se describió en el **Capítulo 4**. También se emplearon 1,6-hexametilendiisocianato (HDI), *N,N'*-dimetilacetamida (DMAc) y éter etílico (Aldrich Chemical Co.), dibutildilaurato de estaño (DBTDL, Fluka) y 2,6-diisocianatohexanoato de metilo (LDI, donado por Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., Japón). La DMAc se purificó mediante secado con tamices moleculares (4 Å) y se destiló a 60 °C a presión reducida (10 torr, T_{eb} DMAc = 165 °C). El resto de los reactivos se empleó sin purificación previa.

5.2.2 Síntesis de poliuretanos segmentados (SPU)

Se sintetizaron dos series de SPU empleando HDI y LDI, siguiendo el método de dos etapas representado para esta reacción en el **Esquema 5.5**.



a) Estructura idealizada de prepolímero de PCL terminado en isocianato (Serie H).



b) Estructura idealizada de SPU empleando A-H-A como extendedor de cadena (Serie H).

Esquema 5.5: Ruta sintética de dos etapas seguida para la obtención de un SPU (Serie H).

Etapas 1: Obtención del macrodiisocianato

Una cantidad predeterminada de PCL diol en DMAc anhidra (100 % p/v DMAc) se hizo reaccionar con HDI o LDI en relación molar [1:2,01] a 80 °C con agitación magnética y atmósfera de nitrógeno. La reacción se llevó a cabo en presencia de DBTDL como catalizador (0,1 % p/p PCL) durante 1 hora, y luego la solución se concentró a un 200 % p/v destilando la DMAc a 45 °C.

Etapas 2: Extensión de cadena

El extendedor de cadena (A-H-A, A-L-A o D-E-D) se disolvió en un volumen mínimo de DMAc (50 % p/v en el caso de A-L-A y D-E-D, y 25 % p/v para A-H-A) y se agregó en relación molar [1:1] con respecto al macrodiisocianato. La reacción de extensión de cadena se llevó a cabo a 80 °C, aproximadamente 6 horas, hasta observar la desaparición de la banda de isocianato ($2265\text{-}2280\text{ cm}^{-1}$) mediante espectroscopía de FTIR. El producto de la reacción se precipitó sobre agua destilada en baño de hielo, excepto para el SPU extendido con D-E-D, que se precipitó sobre éter en baño de hielo. Finalmente, los polímeros se lavaron dos veces, se filtraron y se secaron bajo vacío hasta peso constante.

Preparación de filmes:

Los filmes se obtuvieron por la técnica de colada de soluciones (*solution casting*) a partir de soluciones preparadas disolviendo los SPU en DMAc (10 % p/v) a 80 °C. Las soluciones se volcaron sobre placas de Petri siliconadas y el solvente se evaporó en estufa a 60 °C. Los filmes obtenidos, de aproximadamente 0,3 mm de

espesor, se secaron bajo vacío aproximadamente 24 horas, hasta peso constante para eliminar el solvente residual.

Las muestras de SPU se designaron como *PXY*, donde *P* corresponde a PCL diol, *X* es H o L para HDI o LDI, respectivamente, e *Y* es H, L o D para A-H-A, A-L-A o D-E-D, respectivamente. De esta manera, los SPU sintetizados empleando HDI conforman la Serie H (PHH, PHL y PHD), mientras que los sintetizados a partir de LDI comprenden la Serie L (PLH, PLL y PLD). El contenido de segmentos duros en los SPU se calculó mediante la siguiente relación:

$$HS(\%) = \frac{\text{masa de (diisocianato + extendedor)}}{\text{masa de (diisocianato + extendedor + macrodiol)}} \cdot 100$$

5.2.3 Métodos de caracterización fisicoquímica

5.2.3.1 Viscosidad intrínseca

La determinación del peso molecular de un amplio grupo de polímeros se efectúa mediante cromatografía de exclusión de tamaños (SEC), empleando THF o CHCl_3 como fase móvil, solventes en los cuales la mayoría de los poliuretanos son muy poco solubles o insolubles. Los poliuretanos, como muchos otros materiales poliméricos, son solubles en solventes más polares, como DMF o DMAc. En estos casos, la cromatografía SEC se efectúa empleando soluciones 0,1 M de LiBr en DMF o DMAc con columnas termostalizadas a 80 °C, condiciones que permiten disolver las muestras y evitan la formación de microgeles. La falta de equipamiento en el país y en los grupos extranjeros con los que existe una vinculación previa para realizar estas determinaciones obligó al uso de la técnica de viscosimetría capilar, la que brinda información relacionada con el peso molecular relativo de los materiales sintetizados.

Se empleó un Viscosímetro Ubbelohde Tipo OC número C682 (Cannon Instrument Company) calibrado, cuya constante es $0,003109 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-2}$. Se prepararon soluciones de los materiales en DMAc en un rango de concentraciones de 0,2 a $0,8 \text{ g} \cdot \text{dl}^{-1}$, y las medidas se realizaron por triplicado en un baño termostalizado a $30 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$, midiendo el tiempo de escurrido entre dos marcas del viscosímetro para el disolvente puro y las soluciones poliméricas (**Anexo I**).

5.2.3.2 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)

Se empleó un espectrómetro Mattson Genesis II a temperatura ambiente. Los espectros fueron obtenidos realizando 64 barridos con una resolución de 2 cm^{-1} . Las muestras líquidas se analizaron colocando alícuotas entre cristales de NaCl. En el caso de filmes de SPU, se empleó el mismo espectrofotómetro con un accesorio de reflectancia total interna atenuada (ATR). El análisis mediante infrarrojo permitió determinar el tiempo de reacción (mediante desaparición de señales de grupos reactivos) y detectar la presencia de determinados grupos funcionales e interacciones intermoleculares puente de hidrógeno.

5.3 Resultados y Discusión

5.3.1 Síntesis de SPU

La puesta a punto de la síntesis de SPU involucró la exploración de diversas condiciones experimentales (ruta sintética, concentración, tiempo de reacción, alimentación de reactivos y catalizadores) para determinar las condiciones óptimas para la obtención de polímeros reproducibles con elevado peso molecular.

Una de las metodologías reportadas en la literatura para sintetizar SPU con segmentos duros predefinidos consiste en la reacción de macrodioles con segmentos duros terminados en isocianato de longitud de cadena uniforme [8]. En esta aproximación, el segmento duro tiene una longitud larga y predeterminada, y genera SPU con segmentos uniformes que poseen una notable influencia en las propiedades mecánicas, particularmente en el módulo, tensión de rotura y resistencia al desgarro. Asimismo, se evitan las reacciones de transesterificación que ocurren en la etapa de extensión de cadena [3] y que incrementan la distribución de tamaños de los segmentos duros. El bloque terminado en isocianato, conformado por tres unidades [diisocianato-extendedor-diisocianato] o cinco unidades [diisocianato-extendedor-diisocianato-extendedor-diisocianato], debe ser soluble en el medio de reacción o tener un punto de fusión suficientemente bajo como para fundirse a la temperatura de la reacción. Por ejemplo, los pentabloques de BDI-BDO-BDI-BDO-BDI resultan solubles en DMSO, por lo que son adecuados para su reacción con macrodioles. Sin embargo, los tribloques

formados por BDI-BDA-BDI no reúnen estas condiciones, y por lo tanto no es posible obtener SPU con estos bloques.

Para explorar la posibilidad de emplear esta ruta sintética se prepararon pentabloques a partir de HDI o LDI y los tribloques extendedores de cadena A-H-A y A-L-A. Estos pentabloques terminados en isocianato, HDI-A-H-A-HDI y LDI-A-L-A-LDI, resultaron insolubles en todos los solventes estudiados. Además, presentaron un punto de fusión por encima de su temperatura de descomposición, debido a la elevada fuerza de cohesión producida por la alta densidad de puente de hidrógeno. Por lo tanto, ante la imposibilidad de prediseñar segmentos duros uniformes conteniendo grupos urea, la síntesis de SPU se efectuó por el método de dos etapas descrito en las **Secciones 5.1.1 y 5.2.2.**

La reacción de polimerización empleando los extendedores A-H-A, A-L-A y D-E-D mostró una dependencia muy fuerte con la concentración de los monómeros, obteniendo mayor peso molecular a mayor concentración. Si bien el peso molecular no se determinó cuantitativamente, los productos obtenidos con reactivos en concentraciones reportadas por otros autores [8-10] resultaron materiales sin consistencia mecánica. Las reacciones efectuadas en masa [11,12] tampoco condujeron a resultados adecuados, debido a la heterogeneidad que introdujo la inmiscibilidad de los componentes de partida.

Por lo tanto, la polimerización se realizó empleando la mínima cantidad de solvente necesaria para mantener la homogeneidad de la reacción y evitar efectos de concentración que pudieran afectar el peso molecular del polímero [6]. Las reacciones se llevaron a cabo hasta observar la desaparición de la banda de grupos isocianato en el espectro FTIR.

El empleo de Sn(Oct)₂, catalizador utilizado en la obtención de poliésteres, condujo a un tiempo de reacción de 10 – 12 horas que favoreció las reacciones de transesterificación en la etapa de extensión de cadena y los SPU no resultaron reproducibles. Por este motivo se seleccionó el DBTDL como catalizador que tiene un efecto pronunciado en la velocidad de reacción isocianato-alcohol y por lo tanto permitió la reducción del tiempo de reacción a la mitad.

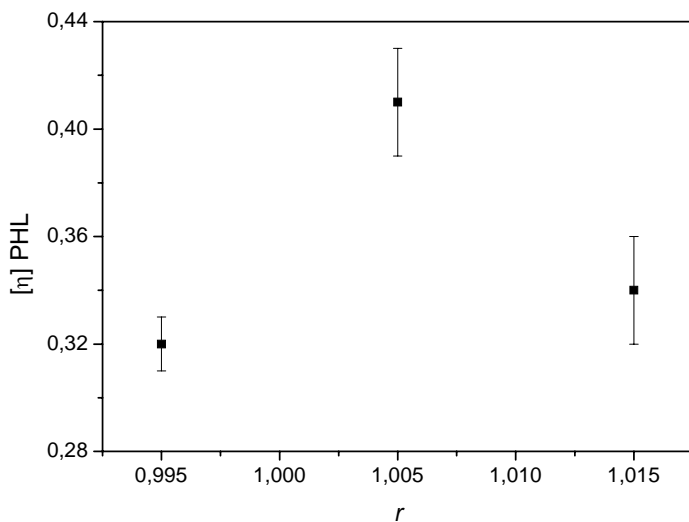
5.3.1.1 Determinación de relaciones estequiométricas óptimas

La parte crítica en el proceso de obtención de poliuretanos, como en cualquier reacción de polimerización por etapas, es la operación de alimentación de los monómeros [2]. Las cantidades de las sustancias reactivas deben monitorearse cuidadosamente para obtener el grado de polimerización requerido. Para obtener poliuretanos lineales con elevado peso molecular la reacción se debe efectuar con cantidades equimolares de grupos funcionales. En el caso de los procesos efectuados en dos etapas, la equimolaridad se refiere a la segunda etapa o etapa de extensión de cadena. El fundamento teórico de esta práctica usual está dado por la ecuación de Carothers, que describe la relación entre el grado de polimerización promedio en número (P_n) de una reacción de policondensación no estequiométrica, la conversión de grupos funcionales (α), y la relación inicial de grupos funcionales (r , por ejemplo $r = [\text{NCO}:\text{OH}]$):

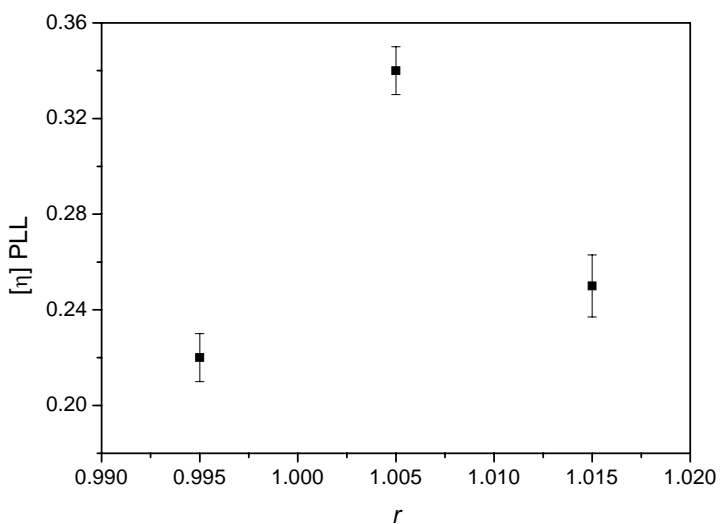
$$P_n = \frac{1+r}{1+r-2 \cdot r \cdot \alpha}$$

En el caso límite de $r = 1$ (condición estequiométrica) $P_n = \frac{1}{1-\alpha}$, y el máximo peso molecular se asegura con una conversión completa.

De este modo, se estudió la relación entre la estequiometría de reactivos empleados y la viscosidad intrínseca del producto final para ambos diisocianatos, empleando A-L-A como extendedor de referencia. Las reacciones con $r = 0,995$, $1,005$ y $1,015$ correspondientes a relaciones molares de [PCL diol : diisocianato : extendedor A-L-A] de [1:1,99:1], [1:2,01:1] y [1:2,03:1], respectivamente, mostraron los siguientes resultados para PHL y PLL:



a)



b)

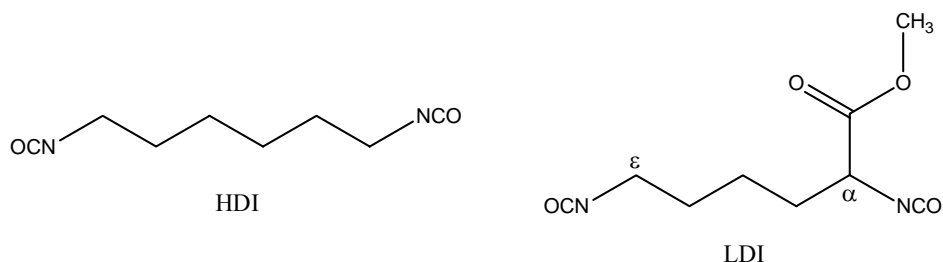
Figura 5.1: Variación de la viscosidad intrínseca en función de la relación estequiométrica r para a) PHL y b) PLL.

Como se observa en la **Figura 5.1**, en el intervalo de relaciones estequiométricas estudiadas, la relación $r = 1,005$ (correspondiente a [1:2,01:1]) permitió obtener los valores de viscosidad intrínseca más elevados en ambos poliuretanos. El ligero exceso de diisocianato tiene en cuenta que existe un pequeño contenido de diisocianatos formando dímeros (**Sección 5.1.1.1**).

5.3.2 Viscosidad intrínseca de SPU

Debido a que las constantes de Mark-Houwink-Sakurada no se determinaron y además son ligeramente diferentes para cada SPU sintetizado, no es posible establecer una correlación exacta entre los valores de viscosidad intrínseca y el peso molecular de los poliuretanos. Sin embargo, dado que cada serie de SPU sólo difiere estructuralmente en el extendedor de cadena, el efecto de éste en la viscosidad intrínseca de los SPU puede aportar información sobre el peso molecular y la asociación de cadenas.

La **Tabla 5.1** presenta los valores de viscosidad intrínseca de los SPU sintetizados. Los SPU de la Serie H exhibieron mayor viscosidad intrínseca que los correspondientes poliuretanos de la Serie L. El HDI tiene una estructura simétrica con grupos funcionales isocianato equivalentes (con igual reactividad), mientras que el LDI tiene una estructura asimétrica y el grupo isocianato unido al carbono primario C_ϵ posee una reactividad mayor que el unido al carbono secundario C_α (**Esquema 5.6**).



Esquema 5.6: Estructuras químicas de los diisocyanatos alifáticos HDI y LDI.

La incorporación de A-H-A y A-L-A en ambas series de SPU no influyó en la viscosidad intrínseca de los materiales, mientras que la presencia de D-E-D produjo un aumento en la viscosidad, posiblemente atribuido al incremento en el peso molecular.

El contenido teórico de segmentos duros en los SPU sintetizados empleando la formulación mencionada anteriormente (**Sección 5.2.2**), se encontró entre 21,8 y 25,9 % p/p (**Tabla 5.1**). Los SPU obtenidos resultaron materiales consistentes y de aspecto blanquecino.

Tabla 5.1: Contenido de segmentos duros y viscosidad intrínseca de los SPU sintetizados (Series H y L).

Serie	SPU	HS (%)	$[\eta]$ (dl.g ⁻¹)
H	PHH	21,8	0,40
	PHL	22,2	0,41
	PHD	23,6	0,49
L	PLH	24,2	0,36
	PLL	24,5	0,34
	PLD	25,9	0,46

5.3.3 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)

El estudio mediante espectroscopía de infrarrojo de las interacciones vía puente de hidrógeno en poliuretanos se centra en dos regiones de interés: la región N-H ubicada entre 3100 y 3600 cm⁻¹ y la región C=O localizada entre 1600 y 1800 cm⁻¹. Los espectros de FTIR de los SPU sintetizados se muestran en las **Figuras 5.2 y 5.3**. Todas las muestras de SPU exhibieron señales correspondientes a grupos enlazados por puente de hidrógeno: grupos uretano y urea (3313 - 3333 cm⁻¹) en polímeros extendidos con A-H-A y A-L-A, y sólo grupos uretano (3368 cm⁻¹) en polímeros extendidos con D-E-D. La presencia de la banda carbonilo-uretano amida I (hombro en 1680 - 1686 cm⁻¹) demostró la formación de grupos uretano que conectan segmentos duros y blandos. Además, en los SPU extendidos con A-H-A y A-L-A se observaron señales en 1615 - 1621 cm⁻¹, asignadas a grupos carbonilo-urea amida I unidos por puente de hidrógeno, y en 1579 - 1589 cm⁻¹, atribuidas a estiramiento de enlaces C-N y flexión de enlaces N-H ($\nu_{C-N} + \delta_{N-H}$) en grupos carbonilo-urea amida II. También se encontraron picos en 1250 - 1258 cm⁻¹ asignados a $\nu_{C-N} + \delta_{N-H}$ en grupos carbonilo-urea amida III. Las bandas amida II y amida III no se detectaron en PLL.

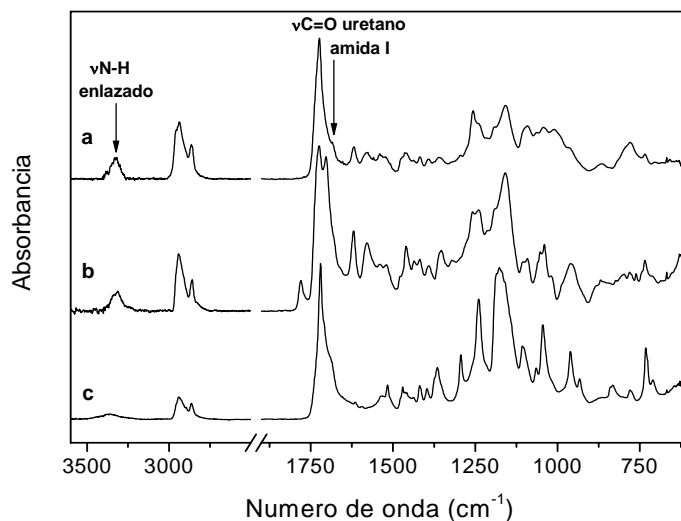


Figura 5.2: Espectros de ATR-FTIR de los SPU de la Serie H: a) PHH, b) PHL y c) PHD.

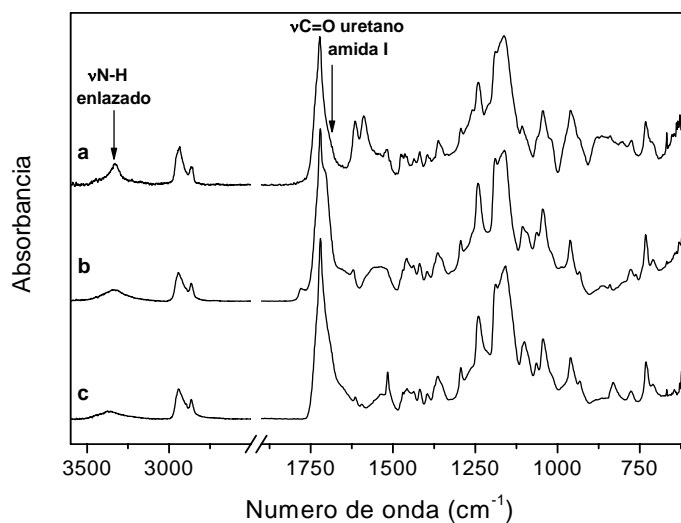
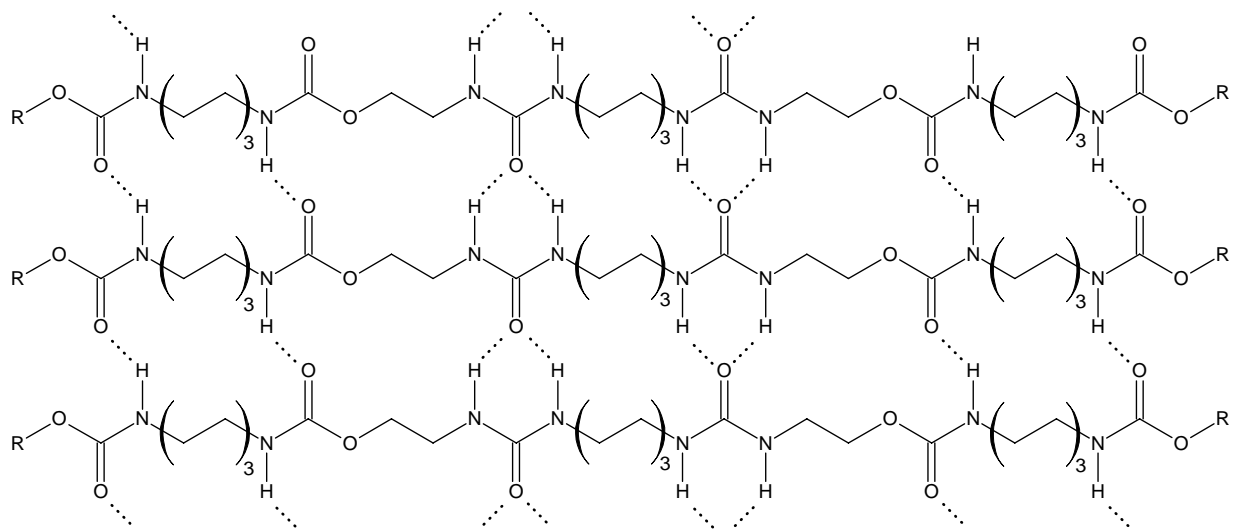
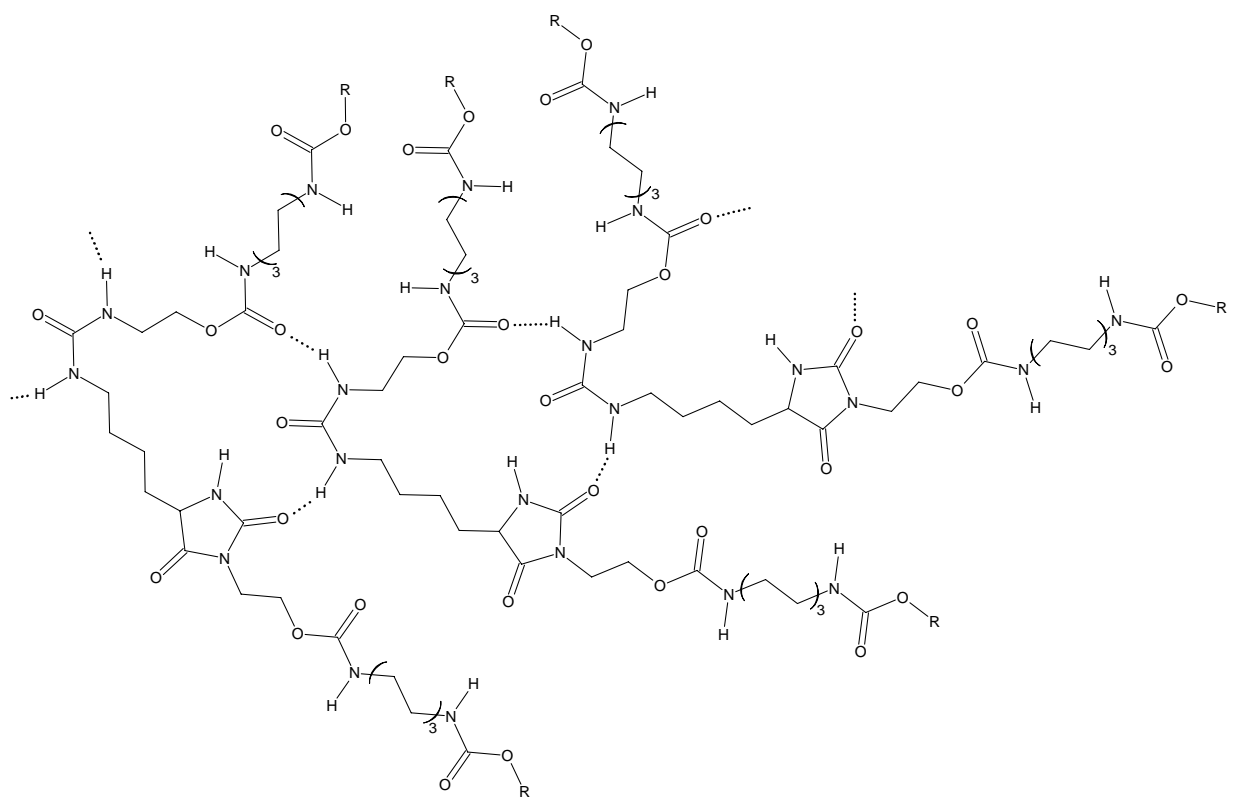


Figura 5.3: Espectros de ATR-FTIR de los SPU de la Serie L: a) PLH, b) PLL y c) PLD.

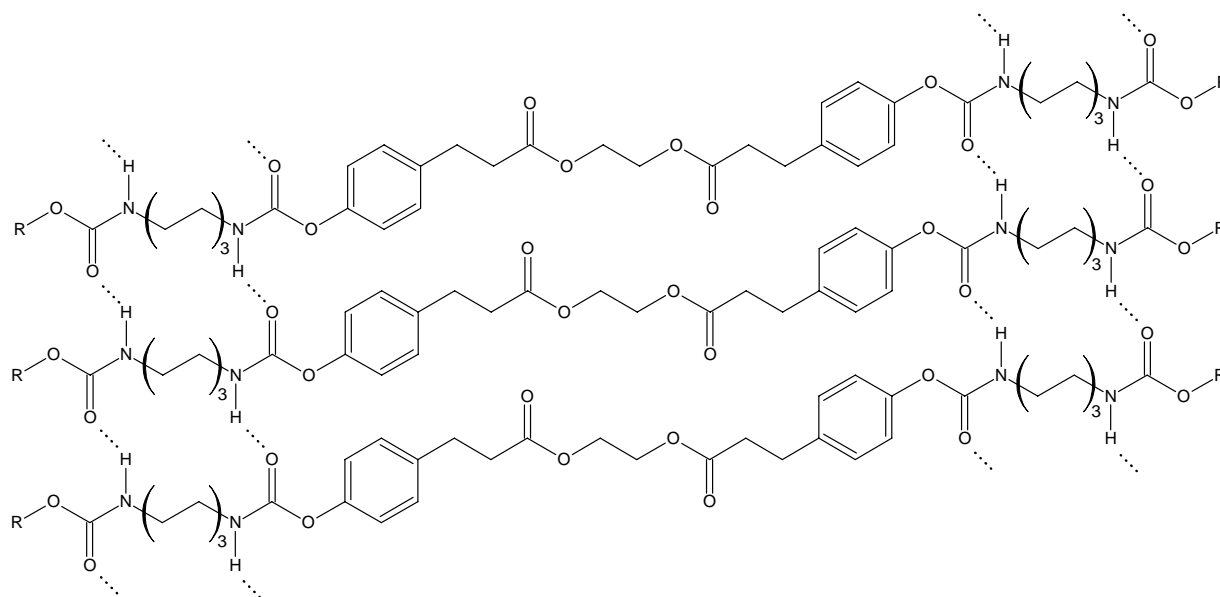
En base al análisis anterior y teniendo en cuenta la estructura química de los componentes de la formulación empleados (macrodiol, diisocianato y extendedor de cadena), se proponen las estructuras químicas idealizadas del **Esquema 5.7** para los dominios de segmentos duros de los SPU de la Serie H, producidos por interacción por puente de hidrógeno e interacción entre nubes π -electrónicas.



a)



b)



c)

Esquema 5.7: Estructuras químicas propuestas para los dominios de segmentos duros producidos por interacción por puente de hidrógeno en a) PHH y b) PHL, e interacción por puente de hidrógeno y entre nubes π -electrónicas en c) PHD.

En los SPU de la Serie L existen varias estructuras posibles debido a que, como se mencionó anteriormente, la estructura asimétrica del LDI conduce a una reactividad diferente de sus grupos isocianato. Por este motivo, las estructuras químicas de los SPU de la Serie L resultan de mayor complejidad y las interacciones presentes entre los grupos funcionales son difíciles de asignar.

5.3.4 Análisis de los parámetros de solubilidad

Los valores de F_{di} , F_{pi} y F_{hi} empleados para el cálculo de los parámetros de solubilidad (δ_d , δ_p y δ_h , **Sección 5.1.2**) se extrajeron de los datos tabulados por Van Krevelen [7, Tabla 7.8], mientras que los valores de volumen libre molar (V) se calcularon de acuerdo a Feedors [7, Tabla 7.3].

En la **Tabla 5.2** se muestran los parámetros de solubilidad calculados para diferentes segmentos duros, segmento blando de PCL, algunos solventes orgánicos y agua. Se presentan los valores calculados para los segmentos duros sintetizados en la tesis y para algunos segmentos duros alifáticos y aromáticos encontrados en poli(éster uretanos) biomédicos reportados en la literatura.

Tabla 5.2: Parámetros de solubilidad para diferentes segmentos y compuestos.

Segmento	δ (J.cm ⁻³) ^{1/2}
<i>Segmentos duros sintetizados en la tesis</i> ^a	
HDI-A-H-A-HDI	23,7
HDI-A-L-A-HDI	25,2
HDI-D-E-D-HDI	23,8
<i>Otros segmentos duros alifáticos</i> ^a	
HDI-HDO-HDI	22,8
HDI-HDA-HDI	20,9
HDI-BDO-HDI	23,4
HDI-BDA-HDI	21,3
<i>Segmentos duros aromáticos</i> ^a	
MDI-EDA-MDI	30,2
MDI-HDA-MDI	28,0
MDI-BDO-MDI	26,2
<i>Segmento blando alifático</i> ^a	
PCL	20,2
<i>Compuestos líquidos</i> ^b	
Dietiléter	15,1
Tetrahidrofurano (THF)	18,6
1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) ^a	18,9
Cloroformo	19,0
Acetona	20,3
ϵ -caprolactona	20,7
<i>N,N'</i> -Dimetilacetamida (DMAc)	22,1
2-propanol	23,5
<i>N,N'</i> -Dimetilformamida (DMF)	24,8
Agua	47,9

^a Valores calculados por el Método de Hoftyzer-Van Krevelen, empleando volumen libre molar calculado de acuerdo a Feedors.

^b Valores reportados por Van Krevelen [6, tabla 7].

Los segmentos duros sintetizados en la tesis presentan valores del parámetro de solubilidad ligeramente mayores a los de otros segmentos duros obtenidos a partir de HDI, aunque menores que los valores correspondientes a segmentos aromáticos derivados de MDI. Se puede inferir entonces que los segmentos duros obtenidos resultan termodinámicamente menos mezclables con la fase blanda de PCL que otros

segmentos basados en HDI. Si bien esta es una predicción meramente termodinámica, existen consideraciones cinéticas y estéricas de los segmentos duros que deben tenerse en cuenta para justificar la separación de fases. Se reportó en la literatura que la movilidad de los segmentos duros aromáticos es menor a la movilidad de los segmentos alifáticos de HDI [13]. En el caso de los segmentos HDI-D-E-D-HDI, la presencia de anillos aromáticos no afectó el parámetro de solubilidad (prácticamente igual al segmento que contiene A-H-A) aunque, como se discutirá en el capítulo próximo, sí afectó las propiedades térmicas y la separación de fases.

5.4 Conclusiones parciales

La exploración de diferentes condiciones experimentales (concentración, catalizadores, alimentación de la reacción, estequiometría) permitió optimizar la síntesis de dos series de poliuretanos segmentados mediante el método de dos etapas en solución. De esta manera se obtuvieron SPU lineales a partir PCL diol, HDI o LDI (Serie H o Serie L) y nuevos extendedores de cadena con funcionalidad urea-diol y diéster-difenol.

La viscosidad intrínseca de los materiales de la Serie H resultó mayor que los correspondientes de la Serie L, sugiriendo que la reacción de polimerización y el grado de interacción entre las cadenas dependen de la naturaleza del diisocianato y del extendedor de cadena empleados.

Teniendo en cuenta el análisis por espectroscopía de infrarrojo y los monómeros empleados en las formulaciones, se propusieron estructuras idealizadas para los segmentos duros de los SPU de la Serie H, en las que existen interacciones por puente de hidrógeno bidentado en PHH, una menor densidad de puente de hidrógeno en el caso de PHL, e interacciones vía puente de hidrógeno y apilamiento π en PHD.

En base a consideraciones termodinámicas, los segmentos duros sintetizados con HDI exhibieron una menor tendencia a mezclarse con segmentos blandos de PCL que otros segmentos duros con HDI reportados en la bibliografía. Esto refuerza la hipótesis de que los extendedores de cadena diseñados favorecerían la separación de fases.

5.5 Referencias

[1] Oertel G. Polyurethane handbook, Berlin: Hanser Publishers, **1990**.

- [2] Krøl P. Linear Polyurethanes. Synthesis Methods, Chemical Structures, Properties and Applications. VSP, Leiden, The Netherlands, **2008**.
- [3] de Groot J.H., Spaans C.J., Dekens F.G., Pennings A.J. On the role of aminolysis and transesterification in the synthesis of ϵ -caprolactone and L-lactide based polyurethanes. *Polym Bull*, 41 (3): 299–306, **1998**.
- [4] Pearson R.G. Specialty Polymers. Capítulo 7, p. 150. (Dyson R.W. ed.), Blackie, Glasgow and London, **1987**.
- [5] Lelah M.D., Cooper S.L. Polyurethanes in Medicine, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, **1986**.
- [6] Brandrup J., Immergut E. H., Grulke E. A. (Editors), Polymer Handbook 4th edition. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc., **1999**.
- [7] Van Krevelen, D. W. Properties of Polymers, 3rd edition, Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, **1990**.
- [8] Spaans C.J., de Groot J.H., Belgraver V.W., Pennings A.J. A new biomedical polyurethane with a high modulus based on 1,4-butanediisocyanate and ϵ -caprolactone. *J Mater Sci Mater Med*, 9 (12): 675–678, **1998**.
- [9] Skarja G.A., Woodhouse K.A. Structure–property relationships of degradable polyurethane elastomers containing an amino acid-based chain extender. *J Appl Polym Sci*, 75 (12): 1522–1534, **2000**.
- [10] Skarja G.A., Woodhouse K.A. *In vitro* degradation and erosion of degradable, segmented polyurethanes containing an amino acid-based chain extender. *J Biomater Sci Polym Ed*, 12 (8): 851-873, **2001**.
- [11] Gorna K., Gogolewski S. Biodegradable polyurethanes for implants. II. *In vitro* degradation and calcification of materials from poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene oxide) diols and various chain extenders. *J Biomed Mat Res*, 60 (4): 592–606, **2002**.
- [12] Gorna K., Gogolewski S. *In vitro* degradation of novel medical biodegradable aliphatic polyurethanes based on ϵ -caprolactone and Pluronics with various hydrophilicities. *Polym Deg Stab*, 75 (1): 113–122, **2002**.

[13] Li Y., Iten Z., Zhao M., Yang H., Chu B. Multiphase structure of segmented polyurethanes: effects of hard-segment flexibility. *Macromolecules*, 26: 612–622, **1993**.

CAPÍTULO 6

EFECTO DE LA COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA QUÍMICA DEL SEGMENTO DURO EN LAS PROPIEDADES TÉRMICAS Y MECÁNICAS DE LOS POLIURETANOS SEGMENTADOS

6.1 Introducción

Además de la estructura primaria (composición química de los bloques o segmentos, longitud y rigidez de cadena, grado de entrecruzamiento, etc.) la morfología de los poliuretanos está determinada en gran medida por las interacciones entre las cadenas poliméricas. Dependiendo de la estructura y la morfología, como en muchos otros tipos de materiales, los poliuretanos muestran un amplio intervalo de propiedades térmicas y mecánicas.

6.1.1 Análisis térmico de SPU

El estudio del comportamiento térmico de poliuretanos segmentados es importante para comprender la morfología y la extensión de las uniones intermoleculares. El análisis mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) permite la observación de múltiples transiciones térmicas correspondientes a la transición vítrea, cristalización y fusión de dominios blandos ($T_{g,s}$, $T_{c,s}$, $T_{m,s}$) y transición vítrea, cristalización y fusión de dominios duros ($T_{g,h}$, $T_{c,h}$, $T_{m,h}$).

La $T_{g,s}$ depende del contenido de segmentos duros y del Mn de los segmentos blandos, por lo que la variación del valor de $T_{g,s}$ en función de la composición o estructura química se emplea como un indicador del grado de separación de microfases [1]. En los poliuretanos formulados con MDI se encontraron diversos factores que afectan este proceso, la cristalización de cada componente, el impedimento estérico de los segmentos duros para formar puente de hidrógeno, y el grado de compatibilidad termodinámica entre los segmentos duros y blandos [2]. La cristalización es el factor más importante para los poliuretanos con segmentos blandos de 2000 Da, mientras que los restantes factores determinan la extensión de la separación de fases en poliuretanos con segmentos blandos de cadenas más cortas.

Las fases blandas ricas en macrodiol se estabilizan principalmente por fuerzas de van der Waals, mientras que las fases duras ricas en segmentos formados por la reacción del diisocianato con el extendedor de cadena, se estabilizan por interacciones de tipo puente de hidrógeno y/o entre las nubes electrónicas π de anillos aromáticos (apilamiento π).

Los segmentos blandos de poliéter y poliéster muestran una disminución de la $T_{g,s}$ con el aumento del peso molecular del macrodiol. Los poli(éter uretanos) muestran

mayor incompatibilidad de segmentos que los poli(éster uretanos), debido a que los grupos éter son menos polares que los grupos éster. Por este motivo, los poli(éster uretanos) tienen valores de $T_{g,s}$ que permanecen relativamente constantes al aumentar el contenido de segmentos duros, indicando que la penetración de segmentos duros aislados en la fase blanda es limitada. En los poli(éster uretanos) la mayor tendencia a la mezcla de fases se demuestra en el aumento de la $T_{g,s}$ con el contenido de segmentos duros [3].

6.1.2 Propiedades mecánicas de SPU

Las propiedades mecánicas observadas en los poliuretanos segmentados lineales están determinadas en gran medida por la separación de microfases. Los segmentos duros presentan puntos de entrecruzamiento físico que refuerzan el material. En general, el comportamiento mecánico de un SPU depende del tamaño y la concentración de dominios duros, el grado de agregación de los segmentos duros en los dominios, la capacidad de las cadenas de orientarse en la dirección del estiramiento, y la capacidad de los dominios blandos de cristalizar en ese proceso [4].

El aumento en el contenido de segmentos duros (manteniendo constante el peso molecular del macrodiol) o de su longitud (manteniendo constante su contenido) produce un incremento del módulo de Young y la dureza del material, así como una disminución de su deformación última [5]. En estos casos aumenta la fracción en volumen de segmentos duros, o bien, su grado de ordenamiento en los dominios (mayor cristalinidad y fases más separadas). Además, los segmentos duros con grupos urea generan dominios duros más cohesivos, presentando también valores elevados de módulo elástico.

En poli(éster uretanos) con extendedor de cadena derivado de fenilalanina se observa una mejora en las propiedades mecánicas con el incremento del contenido de segmentos blandos [6], lo que se atribuye a tres factores:

a) Los diisocianatos asimétricos y extendedores de cadena voluminosos dificultan la cristalización de dominios duros, reduciendo su capacidad para actuar como agentes de refuerzo o como sitios de entrecruzamiento físico. Por lo tanto, el aumento del contenido de segmentos duros no mejora en este caso las propiedades últimas del material.

b) La cristalización de dominios blandos de PCL puede ser preponderante en la resistencia y rigidez del polímero. Los dominios blandos cristalinos pueden actuar como puntos de entrecruzamiento físico de manera similar a la que normalmente se atribuye a los dominios duros.

c) El incremento en el grado de separación de fases observado con el aumento del contenido de PCL conduce a mejores propiedades mecánicas. Este fenómeno resulta del incremento en la cohesión de los segmentos duros, debida a una morfología de fases segregadas. Por lo tanto, resulta de importancia tanto la cristalinidad de los dominios blandos como el grado de la separación de fases.

Las reacciones de transesterificación, que pueden producirse eventualmente en la etapa de extensión de cadena, afectan seriamente la distribución de segmentos duros y deterioran las propiedades mecánicas. La mejora de la distribución de segmentos y, en consecuencia, de las propiedades mecánicas de los SPU, se puede lograr con el empleo de segmentos duros uniformes “pre-armados” [7,8], estrategia comentada en la **Sección 5.3.1**.

Los isocianatos simétricos y extendedores con un número par de átomos de carbono empacan en una red cristalina mucho más efectivamente que moléculas asimétricas con un número impar de átomos de carbono. La rigidez del segmento duro también afecta las propiedades mecánicas. Los grupos aromáticos introducen unidades grandes, rígidas y planas que aumentan significativamente la rigidez de la cadena principal y mejoran la cristalinidad. La atracción entre nubes de electrones π también favorece la atracción entre cadenas. Las ramificaciones laterales impiden a las moléculas empaquetarse en una red cristalina, en este sentido, moléculas lineales promueven la cristalinidad del segmento duro más que moléculas ramificadas.

En un sistema multifase, el comportamiento mecánico en tracción está estrechamente relacionado con la morfología de los dominios y la separación de fases. El ciclo de carga-descarga exhibe cierto grado de histéresis en la curva tensión-deformación. Este fenómeno se atribuye a la fluencia o disrupción de los segmentos duros con la deformación, lo que disminuye su capacidad de reforzar la fase gomosa. La histéresis es una función de la ductilidad y la capacidad de reestructuramiento del material, y depende de la naturaleza y el grado de mezcla de fases en la interfase de dominios [9].

El proceso de fractura puede representarse por tres etapas: inicio de microfisuras, propagación lenta y falla catastrófica del material [10,11]. Las fases dispersas tienden a interferir con el paso de propagación de fisuras, redistribuyendo energía que de otro modo causaría su aumento de tamaño hasta la rotura del material. Por otra parte, las fisuras pueden ser conducidas a los límites de fases. Así, una morfología bifásica es esencial para tener elastómeros de elevada tenacidad. La resistencia se mejora con segmentos duros largos y rígidos, con alta energía cohesiva. Aunque las interacciones de tipo puente de hidrógeno pueden contribuir a la cohesividad de los dominios, el enlace puente de hidrógeno en si mismo no es directamente responsable de la resistencia de los poliuretanos.

En este capítulo se examina la relación entre la composición y estructura química del segmento duro y las propiedades térmicas y mecánicas de los SPU sintetizados en el capítulo anterior.

6.2 Métodos

6.2.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La determinación de las propiedades térmicas de los productos sintetizados (temperaturas de transición vítrea, temperaturas y entalpías de fusión y temperaturas y entalpías de cristalización) se llevó a cabo en un calorímetro Shimadzu DSC-50, empleando purga de nitrógeno y una velocidad de barrido de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, en el intervalo de temperaturas de $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. La T_g se midió en el inicio de la transición (*onset*). El porcentaje de cristalinidad del segmento blando (X_c) se calculó mediante la relación:

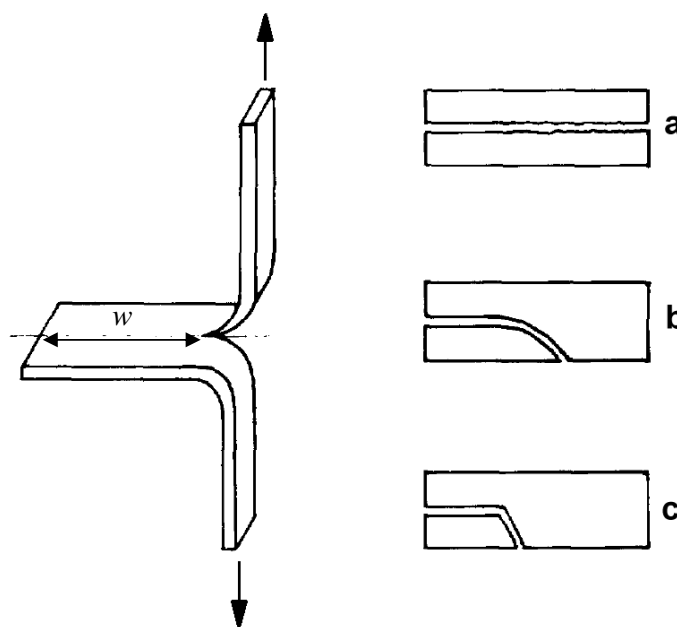
$$X_c = \frac{\Delta H_m \text{ experimental}}{\left(\frac{100 - \%HS}{100} \right) \Delta H_m \text{ teórico}} \cdot 100$$

donde $\Delta H_m \text{ experimental}$ es la entalpía de fusión de dominios blandos por gramo de SPU, $\%HS$ es el porcentaje de segmentos duros en el poliuretano (valores determinados en la **Sección 5.3.2**), y $\Delta H_m \text{ teórico}$ es la entalpía de fusión para PCL 100% cristalina ($148,05\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$), valor empleado en el **Capítulo 3**.

6.2.2 Ensayos mecánicos

Los ensayos de tracción uniaxial se realizaron empleando probetas rectangulares de 35 mm x 5 mm x t mm (donde $t = 0,4 \pm 0,1$) cortadas de filmes de los SPU. Se utilizó una máquina universal de ensayos Instron Modelo 4467 con un extensómetro para elastómeros (Instron), una celda de carga de 100 N y una velocidad de travesa de $5 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$. Los ensayos se efectuaron a temperatura ambiente ($18 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$).

Para los ensayos de desgarro (*tear strength*) se utilizaron probetas rectangulares de 37,5 mm de largo y 12,5 mm de ancho, con un corte longitudinal de 25 mm (longitud de propagación de desgarro de 12,5 mm), empleando una velocidad de travesa de $250 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ (ASTM D1938-02). El **Esquema 6.1** muestra la geometría de la probeta, el modo de sollicitación y los diferentes modos de propagación del desgarro.



Esquema 6.1: Probeta empleada en el ensayo de desgarro y diferentes modos de propagación del desgarro: a) correcto, b) y c) incorrectos.

La energía de desgarro (G_t) se determinó como:

$$G_t = 2 \cdot \frac{F}{w}$$

donde F es la fuerza para el desgarro sobre la longitud del camino desgarrado, w , multiplicada por dos debido a la formación de dos nuevas superficies [12]. Se empleó la fuerza máxima ya que el film es altamente deformable; para materiales con baja ductilidad se emplea la fuerza promedio de desgarro.

En todos los casos se ensayaron al menos cuatro probetas para cada material y se promediaron los resultados obtenidos.

6.3 Resultados y Discusión

6.3.1 Propiedades térmicas

Los SPU exhiben un comportamiento térmico asociado fuertemente a su historia térmica y al método de procesamiento. Las propiedades térmicas de los SPU, presentadas en la **Tabla 6.1**, se determinaron durante el primer barrido de temperatura. El segundo barrido se efectuó con muestras llevadas previamente desde una $T > T_{m,h}$ hasta $T < T_{g,s}$ por inmersión en nitrógeno líquido, o bien dejando enfriar la muestra a la velocidad de enfriamiento no controlada del equipo. En ambos casos sólo se observaron las transiciones asociadas a los dominios blandos ($T_{g,s}$ y $T_{m,s}$) y en el caso de enfriamiento brusco se observó además la cristalización de dominios blandos ($T_{c,s}$). En la **Tabla 6.2** se detallan algunas propiedades de poliuretanos, sintetizados a partir de PCLdiol₂₀₀₀, diisocianatos alifáticos y diversos extendedores de cadena, reportadas en la literatura.

PHH presentó una $T_{g,s}$ de -61,4 °C, mientras que PHL mostró un valor muy cercano (-61,1 °C). Estos valores de $T_{g,s}$ resultaron ligeramente inferiores a los de los SPU correspondientes de la Serie L, y los más cercanos a la transición vítrea del macrodiol (T_g PCL diol = -69,3 °C). Esto indica la presencia de microfases con cierto grado de separación en los SPU extendidos con A-H-A y A-L-A. Cabe señalar que los valores de $T_{g,s}$ de PHH y PHL resultaron los más bajos encontrados en la literatura (**Tabla 6.2**). Por otra parte, los polímeros extendidos con D-E-D (PHD y PLD) mostraron valores de $T_{g,s}$ cercanos a -53 °C, desviación que refleja la existencia de una morfología con un mayor grado de mezcla de fases.

Tabla 6.1: Propiedades térmicas de los SPU sintetizados (Series H y L).

Serie	SPU	$T_{g,s}$ (°C)	$T_{m,s}$ (°C)	$\Delta H_{m,s}^a$ (J g ⁻¹)	X_c (%)	$T_{g,h}$ (°C)	$T_{m,h}$ (°C)	$\Delta H_{m,h}^a$ (J g ⁻¹)
	PHH	-61,4	27,0 / 39,9	31,5	27,2	108,2	162,2 / 171,4	3,4
H	PHL	-61,1	29,0 / 44,4	35,0	30,4	-	101,1	6,4
	PHD	-53,2	26,6 / 39,3	29,8	26,4	-	-	-
	PLH	-59,5	29,6	29,1	25,9	65,6	160,6 / 174,0	10,1
L	PLL	-58,9	36,0	50,0	44,7	-	82,0	3,2
	PLD	-53,1	31,6	21,1	0,5	-	-	-

^a Entalpía de fusión expresada por gramo de SPU.

Como se observa en la **Figura 6.1**, los termogramas de los poliuretanos de la Serie H mostraron dos picos endotérmicos ($T_{m,s}$) asociados a la fusión de dominios blandos, mientras que los termogramas de la Serie L (**Figura 6.2**) presentaron un único pico endotérmico. En ambas series, los valores de $T_{m,s}$ resultaron menores que la temperatura de fusión del macrodiol (T_m PCL diol = 50,5 °C), lo que puede atribuirse a la formación de fases cristalinas de menor extensión y dominios paracristalinos. El análisis de las entalpías de fusión ($\Delta H_{m,s}$) evidenció el efecto de la conectividad entre los segmentos duros y blandos en la cristalización. La restricción en la movilidad de cadenas en los SPU produjo una notable disminución de la X_c de los dominios blandos de PCL (X_c PCL diol = 65,5 %). PLD resultó el único poliuretano con capacidad de cristalizar durante el primer barrido de DSC, mostrando un pico exotérmico (20,5 J.g⁻¹) ancho, centrado en 5,2 °C. Los dominios cristalinos formados fundieron a 31,6 °C, siendo la cristalinidad de PLD prácticamente despreciable ($X_c = 0,5$ %).

De los SPU de la Serie H, sólo PHH exhibió una transición de segundo orden, correspondiente a $T_{g,h}$ (108,2 °C). A mayor temperatura se observó un pequeño pico exotérmico (130,6 °C), seguido por dos picos endotérmicos a 162,2 °C y 171,4 °C. Estas transiciones se pueden atribuir respectivamente a la cristalización y fusión de dominios duros con diferente grado de ordenamiento. La presencia de grupos funcionales con alta energía cohesiva (dos grupos uretano y dos grupos urea) en los segmentos duros de PHH, sumada a la simetría estructural (**Esquema 5.7a**), contribuyeron al incremento de la separación de fases. Por su parte, PHL exhibió un pico endotérmico a 101,1 °C

asignado a la fusión de dominios duros. En este caso, la estructura asimétrica del extendedor de cadena A-L-A no evitó la asociación de segmentos duros mediante interacciones por puente de hidrógeno entre grupos funcionales urea, uretano y carbonilo de hidantoína (**Esquema 5.7b**). En el material PHD no se observaron transiciones térmicas correspondientes a dominios duros (**Figura 6.1**), lo cual puede atribuirse a que los extendedores de cadena voluminosos dificultan el ordenamiento que conduce a la cristalización de segmentos duros [6].

A pesar de la existencia de muchos trabajos en la literatura que estudian poli(éster uretanos) y poli(éster uretano ureas) formulados con PCL₂₀₀₀ (**Tabla 6.2**), existen muy pocos que reportan la presencia de transiciones térmicas de dominios duros. Entre éstos se encuentran SPU formulados con HDI que emplean como extendedores de cadena BDA [19] o un derivado de fenilalanina [13]. PHH resultó el único SPU formulado con HDI que mostró $T_{g,h}$, además de elevadas $T_{m,h}$, en comparación con todos los materiales descriptos hasta el presente.

La longitud de cadena promedio y distribución de longitudes de cadena de los segmentos duros determina también las propiedades térmicas de los SPU. Como se observa en la **Tabla 6.2**, los SPU formulados con PCL₂₀₀₀, BDI y extendidos con BDA [8,19], BDO [8,20] y BDO-BDI-BDO [7] exhiben $T_{m,h}$ y $\Delta H_{m,h}$ con distintos valores. Aunque el BDI también es simétrico y los SPU presentan fuerzas intermoleculares similares a las de los SPU sintetizados en esta tesis, la presencia de segmentos duros de menor longitud favoreció la formación de dominios duros cristalinos. Sin embargo, este aspecto por sí solo no asegura el mejor conjunto de propiedades térmicas y mecánicas para un material.

Tabla 6.2: Propiedades térmicas y mecánicas de SPU formulados con PCL₂₀₀₀ diol reportados en la literatura para aplicaciones biomédicas.

Ref.	SPU	Propiedades térmicas					Propiedades mecánicas					
		$T_{g,s}$ (°C)	$T_{m,s}$ (°C)	$\Delta H_{m,s}$ (J.g ⁻¹)	$T_{m,h}$ (°C)	$\Delta H_{m,h}$ (J.g ⁻¹)	E (MPa)	σ_u (MPa)	ϵ_u (%)	σ_y (MPa)	ϵ_y (%)	G_t (kJ.m ⁻²)
13	PCL ₂₀₀₀ : HDI : Phe	-51,9	45,3	63,0	75,7	-	-					
16	PCL ₂₀₀₀ : HDI : BDO	-57,6	43,0	23,0	-	-	9,8	47,2 ^{@200}	723			
	PCL ₂₀₀₀ : IPDI : BDO	-45,8	40,2	36,7	-	-	52	6,4 ^{@200}	100			
17	PCL ₂₀₀₀ : HDI : BDO	-	-	-	-	-	8,5	36,2 ^{@200}	806			
19	PCL ₂₀₀₀ : BDI : BDA	-56,7	20,2	22,8	218,5	10,5	52	29 ^{@10}	1042			161
	PCL ₂₀₀₀ : LDI : BDA	-52,1	40,5	15,9	90,9	11,5	40	17 ^{@10}	800			36
	PCL ₂₀₀₀ : HDI : BDA	-51,0	21,5	17,3	129,0	10,0	38	38 ^{@10}	1168			137
14	PCL ₂₀₀₀ : BDI : eLys	-54,3	44,7	-	-	-	38	13 ^{@10}	841			
	PCL ₂₀₀₀ : BDI : BDA	-53,2	40,2	-	-	-	78	29 ^{@10}	660			
7	PCL ₂₀₀₀ : BDI : BDO-BDI-BDO	-54,0	16,7	11,0	130,4	14,5	70	44 ^{@10}	560			
	PCL ₂₀₀₀ : BDI-BDO-BDI-BDO-BDI	-60,4	9,2	13,9	128,3	24,2	105	35 ^{@10}	650			
8	PCL ₂₀₀₀ : BDI : BDA	-57,0	19,7	28,0	189,0	10,8	145	46 ^{@10}	835			352
	PCL ₂₀₀₀ : BDI : BDO	-54,0	24,3	9,3	68,5	11,2	23,2	23,1 ^{@10}	843			158
	PCL ₂₀₀₀ : BDI : BDO-BDI-BDO	-54,0	17,9	9,1	130,4	14,5	70	45 ^{@10}	560			188
20	PCL ₂₂₀₀ : BDI : BDO	-56,4	16,4	11,5	79,5	15,0	30,1	38,4	1150	4,8	29,6	97
6	PCL ₂₀₀₀ : LDI : Phe	-51,9	45,1	-	-	-	81,9	30,8 ^{@500}	676			
31	PCL ₂₀₀₀ : LDI : BDO	-58,9	36,2	-	-	-	-	23 ^{@100}	1700	-	-	-
15	PCL ₂₀₀₀ : LDI : BDO	-	-	-	-	-	-	32 ^{@10}	1000	8,0	20,0	
22	PCL ₂₀₀₀ : LDI : eLys (1:2,5:1,5)	-59,4	37,6	6,6	-	-	153	34 ^{@20}	1460	9,3	11,3	
	PCL ₂₀₀₀ : LDI : eLys (1:3:2)	-59,5	36,8	0,7	-	-	291	28,3 ^{@20}	1240	14,9	10,6	
	PCL ₂₀₀₀ : LDI : eOrn	-59,0	40,6	24,9	-	-	130	23,5 ^{@20}	1310	8,8	17,6	
18	PCL ₂₀₀₀ : HMDI : BDO	-54,7	35,0	25,1	52,0	5,2	10	47 ^{@200}	720			
21	PCL ₂₀₀₀ : HMDI : BDO	-51,0	45,0	-	-	-	11	33 ^{@12.7}	780			
12	PCL ₂₀₀₀ : CHDI : CHDM	-53,6	3,5	11,0	223,8	5,4	46	33 ^{@12}	950			114

E: Módulo de Young; σ_u y ϵ_u : tensión y deformación últimas; σ_y y ϵ_y : tensión y deformación de fluencia; @: xxx mm.min⁻¹; G_t : energía de desgarro.

Los resultados reportados sobre el análisis de las propiedades térmicas de SPU empleando LDI, extendidos con etil éster de lisina y ornitina [22], derivado de fenilalanina [6] o tiramina [23], evidenciaron la ausencia de transiciones térmicas de dominios duros. Los únicos SPU formulados con LDI en los que se observaron estas transiciones son los extendidos con BDA [19], que exhibieron una endoterma centrada en 90,9 °C, asignada a la fusión de dominios duros. Sin embargo, las muestras de PLH y PLL presentaron dominios duros semicristalinos con algunas diferencias relevantes. Si bien ambos polímeros contienen un derivado de lisina que conecta los segmentos blandos con los extendedores de cadena, PLL exhibió una exoterma muy ancha de baja $\Delta H_{m,h}$, mientras que PLH mostró una $T_{g,h}$ (65,6 °C) y dos picos agudos con la mayor $\Delta H_{m,h}$ observada en ambas series. A pesar de la estructura asimétrica del macrodiisocianato terminado en LDI, la capacidad de los polímeros extendidos con A-H-A de asociar sus cadenas de segmentos duros mediante puente de hidrógeno permitió el mejor empaquetamiento de los dominios duros. En el caso de PLD, al igual que en PHD, no se observaron transiciones térmicas correspondientes a segmentos duros. Como se mencionó anteriormente, este hecho puede atribuirse a la presencia de una morfología de fases menos separadas.

Por lo tanto, en los SPU de ambas series, la composición y estructura de los extendedores de cadena tuvo un efecto significativo en la química de segmentos duros.

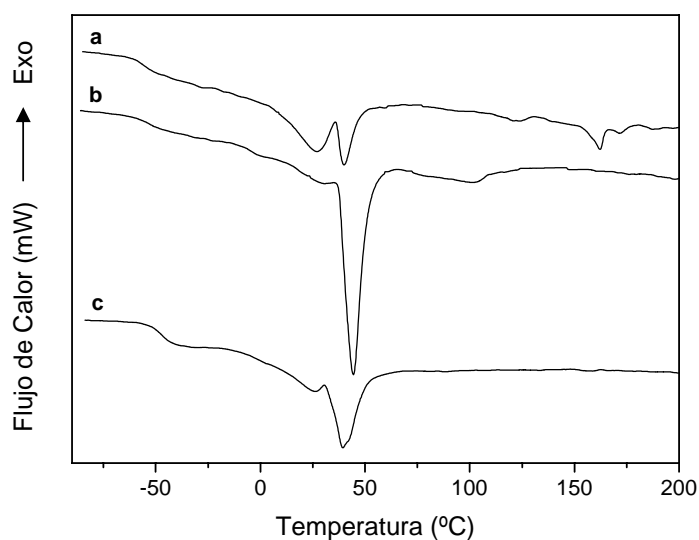


Figura 6.1: Termogramas de DSC de los SPU de la Serie H: a) PHH, b) PHL y c) PHD.

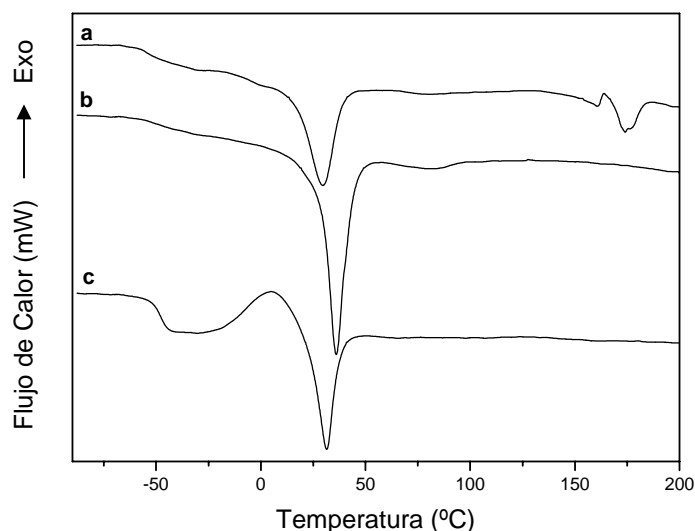


Figura 6.2: Termogramas de DSC de los SPU de la Serie L: a) PLH, b) PLL y c) PLD.

6.3.2 Propiedades mecánicas

6.3.2.1 Ensayos de tracción uniaxial

Los resultados de las propiedades mecánicas determinadas mediante ensayos de tracción uniaxial se resumen en la **Tabla 6.3**, donde se muestran los valores de módulo de Young (E), tensión y deformación últimas (σ_u y ε_u , respectivamente), tensión y deformación de fluencia (σ_y y ε_y , respectivamente) y energía de desgarro (G_t).

Tabla 6.3: Propiedades mecánicas de los SPU determinadas mediante ensayos de tracción uniaxial.

Serie	SPU	E (MPa)	σ_u (MPa)	ε_u (%)	σ_y (MPa)	ε_y (%)	G_t (kJ.m ⁻²)
	PHH	16 ± 4	5,1 ± 0,3	469 ± 38	-	-	10,3
H	PHL	56 ± 3	7,0 ± 2,0	619 ± 155	5,2 ± 0,4	34 ± 8	8,9
	PHD	54 ± 4	6,9 ± 1,5	1006 ± 120	3,4 ± 0,9	19 ± 6	34,0
	PLH	8 ± 2	1,1 ± 0,6	53 ± 18	-	-	6,5
L	PLL	4,7 ± 1,6	0,2 ± 0,1	8,7 ± 0,7	-	-	0,4
	PLD	49 ± 3	2,2 ± 0,7	6,7 ± 1,4	-	-	3,0

La **Figura 6.3** muestra las curvas de tensión-deformación para los SPU de la Serie H. En esta serie se encontraron dos tipos diferentes de comportamiento. Por un lado, PHH se comportó como un elastómero blando, con módulo de Young y propiedades últimas inferiores a las mostradas por los poliuretanos PHL y PHD. El aumento de la tensión con la deformación produjo un alineamiento de cadenas hasta su máxima extensión previa a la rotura en este material. Resulta evidente que la estructura química y la simetría de HDI y el extendedor de cadena A-H-A incrementan las fuerzas de atracción secundarias entre cadenas paralelas, formando un empaquetamiento más denso y aumentando la capacidad de los segmentos duros de actuar como sitios de entrecruzamiento físico (**Esquema 5.7a**). En la misma serie, PHL y PHD poseen estructuras de segmentos duros diferente (**Esquemas 5.7b y 5.7c**), comportándose como poliuretanos más tenaces. Estos polímeros presentaron un punto de fluencia seguido por la formación de un cuello en la probeta, región en la que tiene lugar una extensa reorganización de las cadenas poliméricas. Una vez alcanzada la tensión de fluencia, la tensión disminuyó ligeramente. En el caso de PHL se produjo deformación plástica a tensión constante (*cold-drawing*) hasta alcanzar un cierto valor en donde el cuello formado se extendió por la probeta. Al final de esta reorganización la tensión aumentó con la deformación hasta que se produjo la rotura del material. PHD presentó una región de *cold-drawing* diferente, donde luego de la fluencia se produjo un aumento de la tensión hasta completar la propagación del cuello. PHD exhibió una deformación última mayor ($\epsilon_u \approx 1000\%$) que PHL, mientras que el módulo de Young y la tensión última resultaron similares para ambos SPU. Los elevados valores de resistencia a la tracción y deformación a la rotura determinaron en PHD la mayor área bajo la curva de tensión-deformación, indicando su mayor tenacidad frente a los otros poliuretanos de la Serie H. En este caso, la estructura simétrica del segmento duro (HDI - D-E-D - HDI) permite el establecimiento de fuerzas de atracción secundarias entre los segmentos duros mediante interacciones de tipo puente de hidrógeno e interacciones entre nubes electrónicas π de anillos aromáticos adyacentes (apilamiento π) (**Esquema 5.7c**).

Los SPU de la Serie L mostraron propiedades mecánicas inferiores que los poliuretanos correspondientes de la Serie H (recuadro de la **Figura 6.3**). PLH presentó un valor de módulo de Young un 50 % menor que PHH, mientras que PLD mostró un módulo ligeramente inferior que el encontrado para PHD. Por su parte, el valor encontrado para PLL resultó el menor de ambas series.

Las diferencias estructurales entre HDI y LDI revelaron diferencias significativas en los poliuretanos extendidos con D-E-D (PHD y PLD). La estructura asimétrica de LDI, que efectúa la conexión entre segmentos blandos y D-E-D, impide la formación de un empaquetamiento ordenado de segmentos duros. Los valores de deformación a la rotura obtenidos para PHD y PLD mostraron una diferencia muy marcada. En el caso de PLD la deformación última se redujo a tan sólo un 7 %, como puede observarse claramente en el recuadro de la **Figura 6.3**. Siguiendo las mismas consideraciones referidas a la estructura química del derivado de lisina, PLL resultó un polímero muy débil. A pesar de haber detectado mediante calorimetría (**Sección 6.3.1**) transiciones endotérmicas correspondientes a la fusión de dominios duros, la asimetría introducida en los segmentos duros por LDI y A-L-A impidió la formación de regiones ordenadas de largo alcance. La estructura química de los segmentos duros de la Serie L tuvo un impacto significativo en las propiedades mecánicas resultantes. Las propiedades observadas dependieron en mayor medida del isocianato, bloque que delimita los segmentos duros.

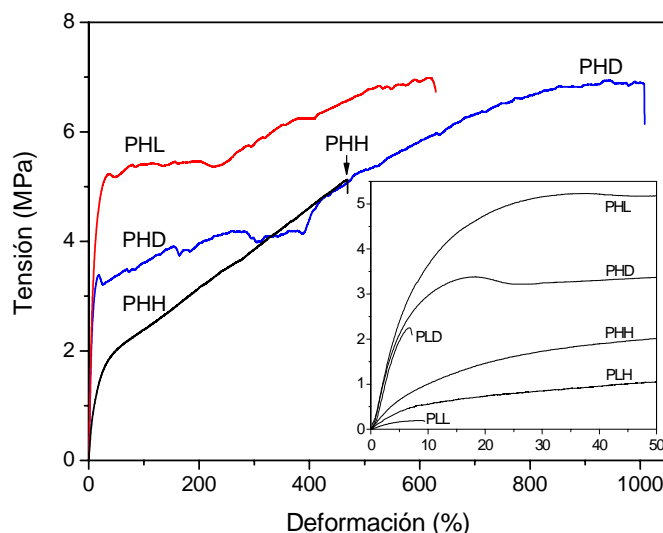


Figura 6.3: Curvas de tensión-deformación en tracción representativas para los SPU de la Serie H. Recuadro: Curvas de tensión-deformación para los SPU de las Series H y L en la región de bajas deformaciones.

Existen pocos trabajos reportados en la literatura donde se estudian las propiedades mecánicas de poli(éster uretanos) y poli(éster uretano ureas) formulados con PCL₂₀₀₀, entre los que se encuentran SPU que emplean HDI, BDO [16,17] y BDA [19] (**Tabla 6.2**). Comparando estos valores con los presentados para PHD, SPU que

presenta las mejores propiedades mecánicas de la Serie H, se observa que PHD posee un mayor módulo (más del 40 %), aunque también una menor tensión última. La presencia de los anillos aromáticos confiere mayor rigidez al material, aunque éste presenta menor densidad de puente de hidrógeno, lo que influye en la magnitud de la tensión última.

Los trabajos en los que se utiliza LDI, emplean BDO [15,31], BDA [19], derivado de fenilalanina [6] y etil éster de lisina y ornitina [22] como extendedores de cadena. Todos los SPU de la Serie L presentan propiedades mecánicas inferiores a las de esos materiales. Resulta evidente que la asimetría del LDI y la complejidad estructural de los extendedores de cadena A-H-A, A-L-A y D-E-D influyen negativamente en las propiedades observadas.

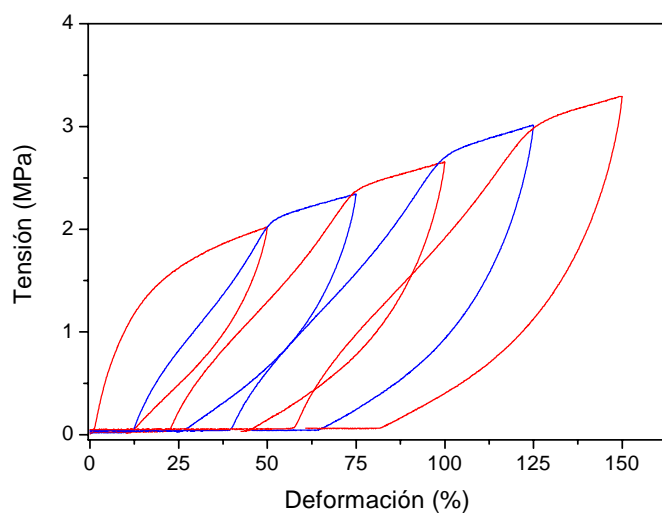
6.3.2.2 Ensayos de carga y descarga cíclica

Como se comentó en la **Sección 6.1.2**, en un sistema multifásico el comportamiento del ciclo de carga y descarga (histéresis) está relacionado con la morfología de los dominios, composición química y separación de fases [24,25]. Las mejores propiedades elastoméricas se han obtenido en poliuretanos con un contenido de 25 % de segmentos duros aislados [26].

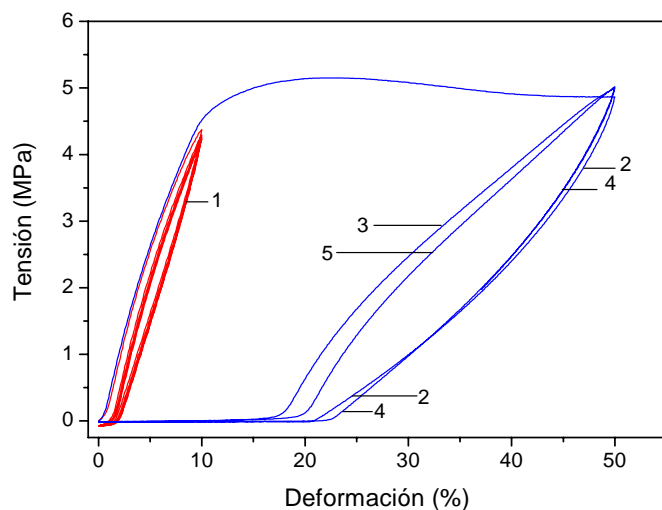
Existen distintos mecanismos responsables de la histéresis a diferentes niveles de elongación. La histéresis se atribuye a la disrupción con la deformación del sistema de puentes de hidrógeno presente en las regiones de dominios duros, conduciendo a una disminución en el refuerzo de la matriz gomosa y promoviendo una deformación permanente. Altos niveles de histéresis a bajas deformaciones pueden resultar de deformación plástica de la estructura vítrea o semicristalina y/o disrupción de los dominios de segmentos duros interconectados. Por otro lado, un comportamiento más gomoso con una recuperación relativamente alta, sugiere una morfología consistente de dominios duros aislados, dispersos en una matriz de segmentos blandos amorfa [5,27].

Los ensayos de carga y descarga cíclica se llevaron a cabo hasta niveles de deformación crecientes, y los resultados para PHH y PHL se muestran en la **Figura 6.4**. PHH presentó dos características de ablandamiento por tensión (*stress softening*) (**Figura 6.4a**). En primer lugar, al someter el material a sucesivos ciclos de deformación se observaron valores de tensión menores que los correspondientes a porcentajes de deformación del ciclo precedente. En segundo lugar, a valores de deformación mayores que los aplicados previamente, los valores de tensión no fueron afectados por la

deformación previa. Este comportamiento de ablandamiento por tensión es característico de materiales separados en fases, y en literatura se citan diversas interpretaciones de este fenómeno [28,29]. La elevada histéresis observada en PHH puede interpretarse como resultado de la alta cohesión e interconectividad de segmentos duros, que incrementa la energía disipada con la deformación. La tensión perturba el ordenamiento en los dominios duros, conduciendo posiblemente a la disociación de algunos puentes de hidrógeno inter-urea [27].



a)



b)

Figura 6.4: Curvas de tensión-deformación en tracción para a) PHH y b) PHL. Los números en las curvas de PHL indican: (1) región elástica, (2) descarga posterior a la fluencia, (3) carga del segundo ciclo, (4) descarga del segundo ciclo, y (5) carga del tercer ciclo.

La **Figura 6.4b** muestra el comportamiento mecánico de PHL. Los ciclos de carga y descarga se llevaron a cabo en la región elástica (1) y luego de fluencia (2 a 5). En la región elástica, la histéresis observada en los ciclos resultó muy baja. La repetición de ciclos (*straining*) produjo un efecto poco significativo en el comportamiento del material, presentando una deformación residual casi constante. Es razonable que en la región elástica no se produzca una modificación significativa en la estructura de los copolímeros en bloque. Superada la tensión de fluencia, se produjo la deformación plástica del material y aumentaron tanto la energía perdida por histéresis como la deformación residual. Como era de esperar, los ciclos siguientes (curvas de carga 3 y 5) partieron desde una muestra predeformada (*prestrained*). Teniendo en cuenta este comportamiento, para ciertas aplicaciones en ingeniería de tejidos se requieren materiales que presenten elevada tensión de fluencia, ya que las deformaciones plásticas (inelásticas) pueden causar la falla catastrófica del dispositivo, por ejemplo, en la apertura y oclusión de válvulas cardíacas [30].

6.3.2.3 Ensayos de desgarro

En determinadas aplicaciones se requiere de la sutura de un material o tejido, por lo que resulta de interés el estudio del desgarro. Los valores de G_t para los SPU se listan en la **Tabla 6.3**. La energía de desgarro de PHL resultó algo menor que la determinada para PHH. Este resultado está de acuerdo con el menor empaquetamiento de segmentos duros en PHL, que implica una mayor facilidad para perturbarlos. PHD mostró el valor más alto de G_t , lo que se puede explicar mediante dos efectos que impedirían la propagación de fisuras: dominios duros con menor energía cohesiva que los que presentan interacciones uretano-urea pueden deformarse más fácilmente, y estos cambios en la morfología pueden favorecer la orientación de cadenas. La energía de desgarro de los SPU de la Serie L resultó inferior a la observada en la Serie H. Nuevamente, la naturaleza del empaquetamiento de los segmentos duros de la Serie L, comparado con los correspondientes polímeros de la Serie H, condujo a una menor resistencia al desgarro. La comparación con los resultados presentados en la literatura es difícil de establecer por la escasez de datos publicados.

Debido a que las propiedades mecánicas dependen fuertemente de las condiciones del ensayo (velocidad de deformación, tipo de mordazas, temperatura y

condiciones ambientales, etc.) éstas se deben tener en cuenta al comparar los resultados observados con los reportados en literatura para polímeros con estructura similar.

6.4 Conclusiones parciales

La variación de la composición de los segmentos duros (diisocianato y extensor de cadena), permitió investigar la relación estructura-propiedades de los SPU sintetizados. La diferente estructura química y simetría de los segmentos duros influyó en la separación de fases en dominios duros y blandos, como se evidenció en el comportamiento térmico de los materiales. La asociación de segmentos duros se incrementó con el diseño de segmentos constituidos por un diisocianato simétrico y/o extensor simétrico (PHH, PHL, PLH). La energía de cohesión de los segmentos duros tuvo un importante efecto en el comportamiento mecánico observado. La incorporación del extensor de cadena aromático produjo efectos opuestos en los poliuretanos de ambas series. PHD exhibió la mayor elongación y energía de desgarro. Sin embargo, PLD mostró un módulo apenas inferior a PHD y la mínima deformación a la rotura.

La Serie H mostró propiedades mecánicas superiores a la Serie L, siendo además PHD el SPU que exhibió las mejores propiedades mecánicas de ambas series. Los valores de energía de desgarro obtenidos desaconsejan el empleo de estos SPU en aplicaciones que requieren suturas. Los SPU de la Serie L encuentran su potencial aplicación en situaciones donde se requiere un comportamiento mecánico con bajo nivel de carga y deformación.

El rango de propiedades obtenidas con el empleo de diisocianatos no tóxicos y las modificaciones introducidas en la estructura de segmentos duros, permitió la preparación de biomateriales muy atractivos para aplicaciones en ingeniería de tejidos blandos. Esto justifica su procesamiento para la obtención de matrices tridimensionales porosas y el estudio de su comportamiento degradativo *in vitro*.

6.5 Referencias

[1] Lelah M.D., Cooper S.L. Polyurethanes in Medicine, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1986.

- [2] Aitken R.R., Jeffs G.M.F. Thermoplastic polyurethane elastomers based on aliphatic diisocyanates: thermal transitions. *Polymer*, 18, 197, **1977**.
- [3] Seymour R.W., Estes G.M., Cooper S.L. Infrared studies of segmented polyurethane elastomers. I. Hydrogen bonding. *Macromolecules*, 3, 579, **1970**.
- [4] Aggarwal S.L., Livigni R.A., Marker L.F., Dudek T.J. en Block and Graft Copolymers (Burke J.J., Weiss V. eds.), Syracuse University Press, Syracuse, New York, USA, p. 157, **1973**.
- [5] Wang C.B., Cooper S.L. Morphology and properties of segmented polyether polyurethane ureas, *Macromolecules*, 16, 775, **1983**.
- [6] Skarja G.A., Woodhouse K.A. Structure–property relationships of degradable polyurethane elastomers containing an amino acid-based chain extender. *J Appl Polym Sci*, 75 (12): 1522–1534, **2000**.
- [7] Spaans C.J., de Groot J.H., Belgraver V.W., Pennings A.J. A new biomedical polyurethane with a high modulus based on 1,4-butanediisocyanate and ϵ -caprolactone. *J Mater Sci Mater Med*, 9 (12): 675–678, **1998**.
- [8] Spaans C.J., de Groot J.H., Dekens F.G., Pennings A.J. High molecular weight polyurethanes and a polyurethane urea based on 1,4-butanediisocyanate. *Polym Bull*, 41 (2): 131–138, **1998**.
- [9] Bonart R. X-Ray Investigations Concerning the Physical Structure of Crosslinking in Segmented Urethane Elastomers. *J Macromol Sci Part B Phys*, 2 (1): 115–138, **1968**.
- [10] Smith T.L. Tensile strengths of polyurethane and other elastomeric block copolymers, *J Polym Sci Part B: Polym Phys*, 12, 1825, **1974**.
- [11] Smith T.L. Strength of elastomers – a perspective. *Polym Eng Sci*, 17, 129, **1977**.
- [12] de Groot J.H., de Vrijer R., Pennings A.J., Klompaker J., Veth R.P.H., Jansen H.W.B. Use of porous polyurethanes for meniscal reconstruction and meniscal prostheses. *Biomaterials*, 17 (2): 163–173, **1996**.
- [13] Skarja G.A., Woodhouse K.A. Synthesis and characterization of degradable polyurethane elastomers containing an amino acid-based chain extender. *J Biomater Sci Polym Ed*, 9 (3): 271–295, **1998**.

- [14] Guan J., Sacks M.S., Beckman E.J., Wagner W.R. Synthesis, characterization, and cytocompatibility of elastomeric, biodegradable poly(ester–urethane)ureas based on poly(ϵ -caprolactone) and putrescine. *J Biomed Mater Res*, 61 (3): 493–503, **2002**.
- [15] Hassan M.K., Mauritz K.A., Storey R.F., Wiggins J.S. Biodegradable Aliphatic Thermoplastic Polyurethane Based on Poly(ϵ -caprolactone) and L-Lysine Diisocyanate. *J Polym Sci Part A Polym Chem*, 44 (9): 2990–3000, **2006**.
- [16] Gorna K., Gogolewski S. Novel biodegradable polyurethanes for medical applications, en *Synthetic bioabsorbable polymers for implants* (Agrawal C.M., Parr J.E., Lin S.T. eds.), ASTM STP 1396, American Society for Testing and Materials, West Conshohocken (PA), 39–57, **2000**.
- [17] Gorna K., Gogolewski S. Biodegradable polyurethanes for implants. II. In vitro degradation and calcification of materials from poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene oxide) diols and various chain extenders. *J Biomed Mater Res*, 60 (4): 592–606, **2002**.
- [18] Gorna K., Polowinski S., Gogolewski S. Synthesis and characterization of biodegradable poly(ϵ -caprolactone urethane)s. I. Effect of the polyol molecular weight, catalyst, and chain extender on the molecular and physical characteristics. *J Polym Sci Part A Polym Chem*, 40 (1): 156–170, **2002**.
- [19] de Groot J.H., de Vrijer R., Wildeboer B.S., Spaans C.J., Pennings A.J. New biomedical polyurethane ureas with high tear strengths. *Polym Bull*, 38 (2): 211–218, **1997**.
- [20] Heijkants R.G.J.C., van Calck R.V., van Tienen T.G., de Groot J.H., Buma P., Pennings A.J., Veth R.P.H., Schouten A.J. Uncatalyzed synthesis, thermal and mechanical properties of polyurethanes based on poly(ϵ -caprolactone) and 1,4-butane diisocyanate with uniform hard segment. *Biomaterials*, 26 (20): 4219–4228, **2005**.
- [21] Van Bogart J.W.C., Gibson P.E., Cooper S.L. Structure-property relationships in polycaprolactone-polyurethanes. *J Polym Sci Polym Phys Edn*, 21 (1): 65–95, **1983**.
- [22] Marcos-Fernández A., Abraham G.A., Valentín J.L., San Román J. Synthesis and characterization of biodegradable non-toxic poly(ester–urethane–urea)s based on poly(ϵ -caprolactone) and amino acid derivatives. *Polymer*, 47 (3): 785–798, **2006**.

- [23] Guelcher S.A., Gallagher K.M., Didier J.E., Klinedinst D.B., Doctor J.S., Goldstein A.S., Wilkes G.L., Beckman E.J., Hollinger J.O. Synthesis of biocompatible segmented polyurethanes from aliphatic diisocyanates and diurea diol chain extenders. *Acta Biomater*, 1 (4): 471–484, **2005**.
- [24] Sung C.S.P., Smith T.W., Sung N.H. Properties of Segmented Polyether Poly(urethaneureas) Based of 2,4-Toluene Diisocyanate. 2. Infrared and Mechanical Studies. *Macromolecules*, 13 (1): 117–121, **1980**.
- [25] Seymour R.W., Allegranza A.E., Cooper S.L. Segmental Orientation Studies of Block Polymers. I. Hydrogen-Bonded Polyurethanes. *Macromolecules*, 6 (6): 896–902, **1973**.
- [26] Abouzahr S., Wilkes G.L., Ophir Z. Structure-property behaviour of segmented polyether-MDI-butanediol based urethanes: effect of composition ratio. *Polymer*, 23 (7): 1077–1086, **1982**.
- [27] Wang T.D., Lyman D.J. Morphology of block copolyurethanes. IV. Effect of synthetic procedure on chain structure. *J Polym Sci Part A Polym Chem*, 31 (8): 1983–1995, **1993**.
- [28] Estes G.M., Cooper S.L., Tobolsky A.V. Block polymers and related heterophase elastomers. *J Macromol Sci Revs Macromol Chem*, C4 (2): 313–366, **1970**.
- [29] Miller J.A., Lin S.B., Hwang K.K.S., Wu K.S., Gibson P.E., Cooper S.L. Properties of polyether-polyurethane block copolymers: effects of hard segment length distribution. *Macromolecules*, 18 (1): 32–44, **1985**.
- [30] Moore T., Ph.D. Thesis, Swinburne University of Technology, Australia, **2005**.
- [31] Han J., Chen B., Ye L., Zhang A-y., Zhang J., Feng Z-g. Synthesis and characterization of biodegradable polyurethane based on poly(ϵ -caprolactone) and L-lysine ethyl ester diisocyanate. *Front Mater Sci China*, 3(1): 25–32, **2009**.

CAPÍTULO 7

ESTUDIO DE PROPIEDADES BIOLÓGICAS *IN VITRO* DE POLIURETANOS SEGMENTADOS

7.1 Introducción

El estudio de la biocompatibilidad *in vitro* e *in vivo* de los biomateriales y dispositivos médicos es un paso imprescindible para ensayar un material cuyo fin sea su implante en humanos, o bien, su interacción con tejido humano. Los ensayos *in vitro* son muy útiles para la evaluación de los efectos biológicos de los biomateriales y tienen como ventaja que no requieren el uso de animales de experimentación, la rapidez con que se realizan los estudios y su relación costo-efectividad. Los cultivos celulares constituyen modelos toxicológicos alternativos de gran sensibilidad para estimar la toxicidad de los biomateriales. Los ensayos *in vitro* permiten el estudio de interacciones a corto plazo y proporcionan información fundamental acerca de algunas interacciones celulares y moleculares con los biomateriales, aunque sólo pueden reproducir parcialmente las condiciones que se presentan *in vivo* [1-3]. Por lo tanto, los ensayos *in vitro* no pueden reemplazar a los ensayos *in vivo*.

En este capítulo se presenta el estudio de algunas propiedades biológicas *in vitro* de los poliuretanos sintetizados correspondientes a la Serie H, debido a que esta serie presenta las propiedades mecánicas más adecuadas para su aplicación en regeneración de tejidos blandos. Para evaluar la respuesta de estos materiales en contacto con sangre, se emplearon diversas técnicas para determinar la adsorción de proteínas plasmáticas, la adhesión y activación de plaquetas, la formación de trombos sobre la superficie y la citotoxicidad.

7.1.1 Interacciones superficiales con el medio biológico

Las interacciones superficiales de los biomateriales poliméricos con el medio biológico son fundamentales para determinar la respuesta de cuerpo extraño o la biocompatibilidad. Por lo tanto, el diseño de materiales biocompatibles requiere el conocimiento y control de estas interacciones.

7.1.1.1 Adhesión de proteínas

A pesar de la extensa literatura publicada en el área, los fundamentos biológicos de las interacciones entre un biomaterial y el medio sanguíneo representan todavía un tema que da lugar a controversias, debido a la multiplicidad y complejidad de eventos adversos que se inician cuando un biomaterial se pone en contacto con la sangre [4,5].

El primer evento que tiene lugar, anterior incluso a la adhesión de plaquetas, es la adsorción rápida de proteínas sobre la superficie [6,7], las que influyen notablemente en la interacción posterior con la sangre. La composición y reversibilidad de esta adsorción y, por lo tanto, la actividad anticoagulante o antitrombogénica del material, depende principalmente de las características de la superficie polimérica.

Si bien no se pueden especificar los parámetros más importantes para comprender la respuesta biológica que tiene lugar en la superficie (probablemente interactúan varios parámetros simultáneamente), se han publicado numerosos estudios que evalúan la rugosidad, la distribución de grupos funcionales aniónicos y la densidad de interacciones electrostáticas en el polímero, el balance hidrofóbico/hidrofílico en la superficie, la segregación en microdominios heterogéneos, etc [8]. Por lo tanto, uno de los mayores retos científicos para mejorar la funcionalidad de los biomateriales es controlar la adhesión proteica, ya sea favoreciendo cierto tipo de conformaciones, o reduciendo la cantidad de proteínas sobre la superficie [9].

El tipo y cantidad de proteínas sanguíneas adsorbidas en la interfase biomaterial-sangre induce la posterior adsorción y activación plaquetaria. El fibrinógeno constituye un componente muy importante de dicha capa proteica, ya que es capaz de inducir los procesos de adhesión y agregación plaquetaria por interacción directa con los receptores plaquetarios GPIIb/IIIa [10]. Chinn y colaboradores demostraron que la adhesión plaquetaria se inhibe casi por completo cuando el plasma es deficiente en fibrinógeno [11]. Por otro lado, se sabe que la adhesión y activación plaquetaria se reduce significativamente en materiales recubiertos con albúmina. Esto se debe a que la membrana plaquetaria no tiene receptores de albúmina y, por lo tanto, no interacciona específicamente con ella [12]. En consecuencia, ambas proteínas se suelen emplear como controles positivos y negativos en los ensayos de trombogenicidad.

Entre las técnicas empleadas para el análisis superficial de biomateriales, muy pocas son capaces de monitorear las interacciones dinámicas que surgen en un ambiente fluido, asemejándose más al medio biológico. Algunas de estas técnicas son la elipsometría, la reflexión interna total, las guías de onda dieléctricas monomodo y la resonancia de plasmón (**Anexo II.1**). El conjunto de todas ellas nos ofrece la posibilidad de estudiar fenómenos dinámicos en un amplio rango de superficies.

La resonancia de plasmón superficial (SPR) es una técnica capaz de monitorear cualquier proceso dinámico [13], tal como adsorción [14,15] o degradación [16], en un número amplio de superficies con interés biomédico [17], en tiempo real, sin necesidad

de marcar el analito ni de complicados procesos preparativos, y con una elevada sensibilidad [7,18]. La SPR permite la obtención de información acerca de la especificidad, extensión y cinética de dichas interacciones y la evaluación de la hemocompatibilidad *in vitro* de la superficie de biomateriales, monitoreando la adsorción superficial de seroalbúmina humana (HSA) y fibrinógeno humano (HFb).

7.1.1.2 Adhesión, agregación y activación plaquetaria

La hemostasia es un mecanismo de defensa que funciona estrechamente ligado a los procesos de reparación tisular y protege la integridad del sistema vascular. La ruptura del fino equilibrio hemostático, provocada por múltiples factores, conduce a la formación de un tapón hemostático constituido por plaquetas (trombo primario/hemostasia primaria) sobre un área lesionada, al que se le añade una red de fibrina (trombo estable secundario/hemostasia secundaria) [19,20]. Las plaquetas, células anucleadas de 2-4 μm de diámetro (**Figura 7.1**), se encuentran en la sangre y se originan de la fragmentación del citoplasma de megacariocitos maduros [20,21]. Éstas desempeñan la función de hemostasia debido a su extraordinaria capacidad de responder a estímulos [22].

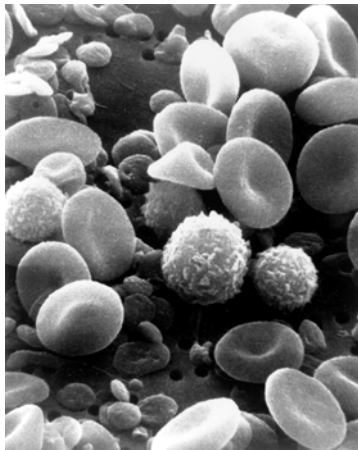


Figura 7.1: Plaquetas observadas con un microscopio electrónico.

El citoesqueleto plaquetario es un gel viscoelástico, responsable de mantener la estabilidad de la membrana, su forma discoide y los cambios morfológicos que experimentan las plaquetas una vez activadas. Las plaquetas tienen un sistema de canalículos que permiten el tráfico de los diferentes mensajeros y proteínas en la activación plaquetaria, así como de la liberación del contenido de los gránulos [23].

Además de gránulos α –que son los predominantes en las plaquetas– y gránulos densos, las plaquetas tienen otros tipos de gránulos: gránulos de glucógeno, lisosomas y microperoxisomas.

La membrana plaquetaria expresa una serie de glicoproteínas (GP) de la familia de las proteínas ricas en leucina (GP Ib) y de la familia de las integrinas (GP IIb/IIIa), que constituyen receptores de los estímulos de adhesión/activación plaquetaria y permiten la interacción/adhesión plaqueta-plaqueta respectivamente [19,20,23-25].

Cuando se lesiona el endotelio vascular, las estructuras del subendotelio se ponen en contacto con el flujo sanguíneo, y por ende con las plaquetas. Se inician entonces interacciones entre las proteínas adhesivas en la pared vascular (Factor de von Willebrand y colágeno) y los receptores de la membrana de las plaquetas (complejos de GP Ib/IX/V y Ia/IIa) [19,20,24,25]. La adhesión de las plaquetas al endotelio vascular mediante fuerzas de deslizamiento inicia los procesos de activación plaquetaria, que involucran una reorganización a nivel de su citoesqueleto generando cambios característicos en la morfología celular debidos a expresión y cambios de conformación de proteínas de membrana. Así, las plaquetas pierden su forma discoide, aumentan su tamaño y comienzan a desarrollar finos pseudópodos formando una monocapa sobre el área afectada.

La agregación plaquetaria (interacción plaqueta-plaqueta) que tiene como propósito final producir un trombo plaquetario que formará el tapón hemostático, aparece como consecuencia de la acción de agentes agonistas con receptores de membrana. Esto induce una serie de reacciones bioquímicas que generan la disponibilidad del complejo de glicoproteínas IIb/IIIa. Este complejo expone un sitio de fijación que interactúa con proteínas adhesivas, en especial con fibrinógeno. El fibrinógeno propicia la formación de puentes plaqueta-plaqueta, lo que garantiza la formación del trombo primario [20,24-28]. La activación de esta glicoproteína constituye un paso fundamental de la agregación plaquetaria [20].

La agregación irreversible ocasiona liberación del contenido intragranular, lo que crea un mecanismo de retroalimentación positiva que activa y atrae más plaquetas al área de lesión, amplificando el estímulo inicial [20]. Todos los eventos en la activación plaquetaria ocurren de modo sinérgico y casi simultáneos, promoviendo la formación y estabilización del tapón plaquetario.

7.1.1.2.1 Ensayos *in vitro*

Los resultados obtenidos a partir de ensayos *in vitro* proporcionan gran información a nivel celular sobre las interacciones plaqueta-superficie y plaqueta-plaqueta.

La adhesión plaquetaria y el grado de activación de las mismas se considera un indicador de la trombogenicidad potencial del biomaterial [29]. Si bien estos parámetros no son suficientes para clasificar a un material como trombogénico y no predicen la extensión de los efectos trombogénicos locales o sistémicos, se ha demostrado que la acumulación y activación de plaquetas en la superficie del material en un intervalo de tiempo corto, pueden provocar el fracaso del material, especialmente en el caso de prótesis vasculares de pequeño diámetro [30]. Por lo tanto, estos experimentos cortos resultan los más apropiados para detectar materiales altamente trombogénicos por la rápida acumulación de plaquetas activadas en su superficie.

La adhesión y grado de extensión de las plaquetas están fuertemente relacionados con su grado de activación. Inicialmente mantienen su forma discoide propia del estado no activado (área 10-15 μm^2). Cuando se activan emiten pseudópodos y adquieren forma circular (área 45-50 μm^2). Lin y colaboradores [31] describieron, entre uno y otro estado, cinco etapas de activación basándose en el grado de extensión de las plaquetas.

En este trabajo, la extensión de la adhesión de plaquetas sobre las diferentes superficies se estudió empleando la técnica de microscopía de epifluorescencia (**Anexo II.2**), mientras que a través de SEM se evaluó la morfología plaquetaria.

7.1.1.3 Expresión de CD62P

Las selectinas son moléculas de adhesión celular que forman una familia de tres glicoproteínas distintas: L-selectina, E-selectina y P-selectina. La P-selectina se almacena en células inactivas, en los gránulos α de las plaquetas y en los cuerpos de Weibel-Palade en las células endoteliales [32].

En condiciones biológicas, las plaquetas circulan en un estado inactivo sin interactuar entre ellas o con otras células en el sistema vascular, como leucocitos o células endoteliales. Luego de la activación por un estímulo externo, tal como el contacto con superficies sintéticas, las plaquetas exponen rápidamente receptores para

propiciar la adhesión, propagación y agregación en sitios vasculares dañados. Se ha reportado que tanto las plaquetas como las células endoteliales inducen la adhesión celular de la molécula P-selectina (CD62P) en el lapso de minutos, seguida de activación con agonistas como trombina [33]. El antígeno CD62P, es un polipéptido de cadena única de 140 kDa. Luego de la adhesión celular, las moléculas de P-selectina regulan la interacción entre plaquetas, leucocitos y células endoteliales, y desencadenan procesos de inflamación y trombosis [34].

La expresión exagerada o sostenida del antígeno CD62P sobre las superficies celulares puede tener enormes consecuencias sobre la pared vascular. De allí la importancia que asumen los mecanismos de internalización a lisosomas involucrados en su desaparición [35].

La expresión de P-selectina (CD62P) se determinó en este trabajo mediante el método ELISA [36] (**Anexo II.3**).

7.1.1.4 Formación de trombos

Un trombo es el producto final de la hemostasia, que se forma en los vasos sanguíneos. Éste es un coágulo sanguíneo formado por fibrina, plaquetas, glóbulos rojos y glóbulos blancos. La embolia es un coágulo que se desplaza desde el sitio donde se formó a otro lugar en el cuerpo. El trombo o embolia puede obstruir el flujo sanguíneo, impidiendo el suministro de oxígeno a los tejidos circundantes. Esto puede ocasionar un infarto e incluso la necrosis de los tejidos que se encuentran en esa área [37].

7.1.1.5 Citotoxicidad

La evaluación toxicológica de cualquier material para aplicaciones biomédicas es una etapa esencial de su desarrollo. Existe una amplia variedad de ensayos y el tipo de ensayo a efectuar está determinado en gran medida por la aplicación específica del material. Los ensayos toxicológicos deberían asegurar tanto como sea posible la seguridad o aceptabilidad del material en las condiciones en las cuales cumple su función. Se trata entonces de determinar la potencial toxicidad de un biomaterial, y tomar medidas para minimizar sus efectos adversos hacia el paciente. Por lo tanto, considerando los riesgos y beneficios de los dispositivos biomédicos, deben emplearse de modo de producir el máximo beneficio con el mínimo riesgo [38].

La línea celular derivada del ovario de hamster chino (CHO) se emplea frecuentemente en la investigación biológica y médica, particularmente en ensayos genéricos, de toxicidad, nutrición y expresión de genes (expresión de proteínas recombinantes). Estas células se cultivan en monocapas y requieren prolina como medio de cultivo. Debido a su rápido crecimiento, alta producción de proteínas, y expresión de genes estable a largo plazo, es la línea celular más elegida, equivalente a la *E. coli* en la investigación biotecnológica.

7.2 Métodos

7.2.1 Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)

La adsorción cuantitativa de albúmina de suero humano (HSA) y fibrinógeno de plasma humano (HFb) sobre las superficies de los SPU se estudió mediante un biosensor de SPR basado en la configuración Kretschmann [39]. Las mediciones se realizaron con la colaboración del Dr. Álvaro A. A. de Queiroz, responsable del Laboratorio de Biomateriales de la Universidad Federal de Itajubá (UNIFEI), Minas Gerais e investigador de la Universidad de São Paulo (USP-IPEN), Brasil.

Se empleó como chip sensor un cubreobjetos de vidrio sobre el que se depositó una capa de Au de 65 nm de espesor (Balzer PLS 500, **Figura 7.2**). La fuente de luz de un láser He-Ne (632,8 nm) se controló con un modulador óptico y se acopló al sistema a través de un prisma de poli(metacrilato de metilo) ($\eta = 1,405$). El haz reflejado se enfocó luego en un detector de fotodiodos, y se obtuvo una señal de SPR en función del ángulo de incidencia medido.

Preparación de la muestra: Sobre una superficie metálica perfectamente limpia se depositó una capa de SPU mediante *spin coating* de solución en DMAc de 1 mg.ml⁻¹ con 12.000 rpm y una aceleración de 7.500 rpmps durante 30 segundos. Posteriormente, las muestras se secaron a 60°C durante 2 horas bajo vacío y se mantuvieron bajo vacío hasta su utilización para mediciones de adsorción de proteínas.

Interacciones SPU-proteínas: Para el estudio de las interacciones de los SPU con las proteínas HSA y HFb se emplearon soluciones proteicas de concentración 4,2 g.dl⁻¹ en caso de HSA y 0,24 g.dl⁻¹ para HFb (Sigma Co.) en solución amortiguadora fosfato 10 mM (PBS, pH 7,4). La temperatura de trabajo fue de 37 °C.

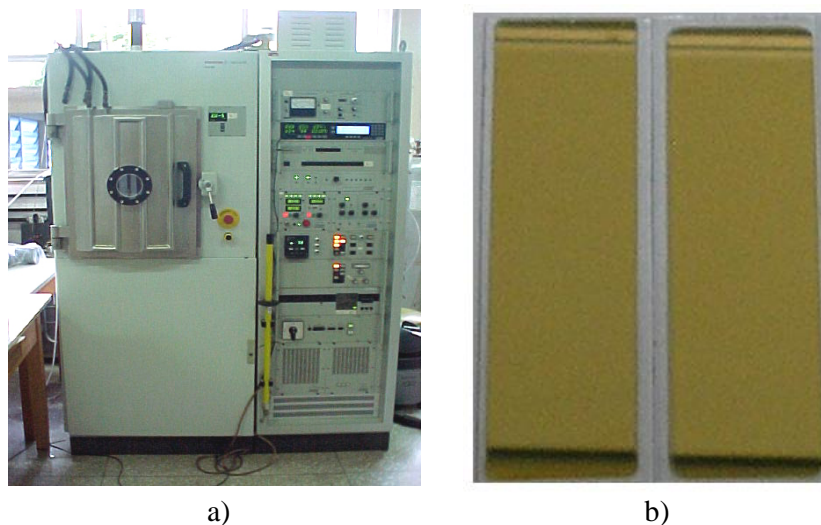


Figura 7.2: a) Equipo Balzer PLS500 empleado para la preparación de electrodos de oro.
b) Sustratos de vidrio recubiertos con oro (espesor = 65 nm).

El sensor se acopló al prisma empleando silicona como agente de acoplamiento, y se montó la celda de fluidos sobre la superficie. Primero se pasó PBS dentro de la celda para obtener un medio de pH fisiológico previo a la adsorción de proteínas, y de aquí se determinó el ángulo de resonancia A_1 mediante el software del equipo de SPR. La solución de proteínas se hizo fluir dentro de la celda a una velocidad de flujo constante de $100 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, y la curva de SPR se monitoreó cada 2 minutos hasta que la lectura del ángulo de resonancia permaneció constante. Luego de 10 minutos se hizo pasar PBS nuevamente dentro de la celda para lavar las proteínas débilmente adsorbidas a la superficie del material, y de aquí se obtuvo el ángulo de resonancia A_2 . Se realizaron al menos cinco ensayos para cada proteína. La cantidad de proteínas adsorbidas se pudo calcular a partir de la variación de los ángulos de resonancia de acuerdo a la relación $c = k \cdot (A_2 - A_1)$, donde c es la concentración de proteínas adsorbidas sobre la superficie del material, y k es la masa de proteínas por unidad de área y por unidad de grado. La sensibilidad de las mediciones por SPR fue de $1 \text{ ng}\cdot\text{mm}^{-2}$ de proteína adsorbida por cada $0,1^\circ$ de desplazamiento. Así, el valor de k fue de $10 \text{ ng}\cdot\text{mm}^{-2}\cdot\text{grado}$.

7.2.2 Expresión de CD62P

Los ensayos de adhesión plaquetaria *in vitro* se llevaron a cabo empleando placas ELISA recubiertas con SPU y sin recubrir. El plasma rico en plaquetas (PRP) se preparó a partir de sangre fresca extraída a donadores adultos saludables que no habían consumido fármacos con aspirina durante al menos 10 días previos a la donación. La sangre se extrajo de venas antecubitales y fue colocada en tubos siliconados con citrato-dextrosa-fosfato como anticoagulante (citrato de sodio dihidrato 10,5 mM, ácido cítrico anhidro 1,7 mM, dextrosa monohidrato 13,6 mM y fosfato monobásico de sodio monohidrato 1,6 mM - CPD) y adenina (CPD-A1, Sigma Co.) en relación 1,4, y centrifugadas a 800 g por 10 minutos a 22 °C para obtener PRP.

Se agregó un volumen de 200 µl en placas recubiertas con SPU y se incubaron a 37 °C por 1 hora. Inmediatamente luego de la incubación, se adicionaron 100 µl de PRP en tubos conteniendo 20 µl del anticuerpo monoclonal anti-CD63 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Immunotech S.A.) y se incubaron durante 1 hora a 25 °C. Luego de lavar dos veces con PBS se agregaron 20 µl del anticuerpo monoclonal anti-CD62P conjugado con ficoeritrina (PE) (Immunotech S.A.) y se incubaron a 25 °C. Luego, las plaquetas se lavaron dos veces con PBS, y se agregaron 50 µl de la enzima (estreptavidina-peroxidasa de rábano picante), incubándose por 30 minutos a 25 °C, y lavándose con PBS. Finalmente, se agregaron 50 µl del sustrato TMB y se dejó al abrigo de la luz durante 15 minutos. La absorbancia de las muestras se determinó a 450 nm empleando un espectrofotómetro [40]. El límite de detección del ensayo ELISA para CD62P fue de 1,05 ng.l⁻¹.

7.2.3 Adhesión plaquetaria

Las placas ELISA recubiertas con SPU y sin recubrir se incubaron en PRP (200 µl) por 30 minutos a 37 °C. Luego de lavar con PBS (pH 7,4), las plaquetas se fijaron con glutaraldehído (solución 1,5 % en PBS) a temperatura ambiente. Se agregaron 10 µl de solución de naranja de acridina y la epifluorescencia de las plaquetas marcadas se detectó empleando una cámara digital (DN 100, Nikon Co.) montada en un microscopio invertido. Una lámpara de vapor de mercurio filtrada en el rango de 450-490 nm se empleó como luz de excitación. Se utilizó un filtro para detectar la señal de fluorescencia con longitud de onda mayor a 515 nm. La morfología de las plaquetas

adheridas sobre las superficies de los filmes de SPU se observó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (JEOL XL30).

7.2.4 Cinética de formación de trombos

Se preparó una solución empleando una parte de solución ácido-citrato-dextrosa (ácido cítrico 0,7 mM, citrato de sodio 9,3 mM y dextrosa 13,6 mM - ACD) por cada nueve partes de sangre humana. La solución resultante se puso en contacto con soportes de vidrio conteniendo los SPU. La coagulación se inició mediante el agregado de una solución de CaCl_2 , y a los 30 minutos se pesaron los trombos formados. El peso relativo de trombos en las diferentes muestras se determinó tomando como referencia el 100 % de los trombos formados en un soporte de vidrio.

7.2.5 Citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo agregando diluciones de los extractos de SPU a cultivos de células de ovario de Hamster Chino (CHO) en placas de Petri (15 x 60 mm²). Se emplearon como controles positivo y negativo soluciones de fenol 0,02 % v/v y polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE) [41], respectivamente.

Preparación de extractos. Los filmes de PHH, PHL, PHD y UHMWPE (6 cm²) se esterilizaron con radiación gamma (25 kGy) y se colocaron en frascos de vidrio de 100 ml junto con 60 ml del medio de cultivo MEM-FBS (medio Eagle con 10 % v/v de suero de feto bovino y 1 % v/v de solución de penicilina y estreptomycin) y se incubaron por 48 horas a 37 °C. Los sobrenadantes se filtraron luego empleando membranas Millipore de diámetro de poro de 0,22 mm, y realizaron diluciones en serie de los extractos de SPU, UHMWPE y fenol (100, 50, 25, 12,5 y 6,25 % v/v).

Preparación de cultivo primario. Las células CHO se cultivaron en botellas de plástico en medio de MEM-FBS, se colocaron luego en una incubadora a 37 °C con una atmósfera 5 % v/v de CO₂ y humedad saturada, hasta obtener una monocapa celular. El medio de cultivo se removió luego de la incubadora, y las células se lavaron con solución salina amortiguadora fosfato, libre de calcio y magnesio (CMF-PBS). Se agregó una solución de 0,2 % p/v de tripsina para despegar las células de la botella. Las

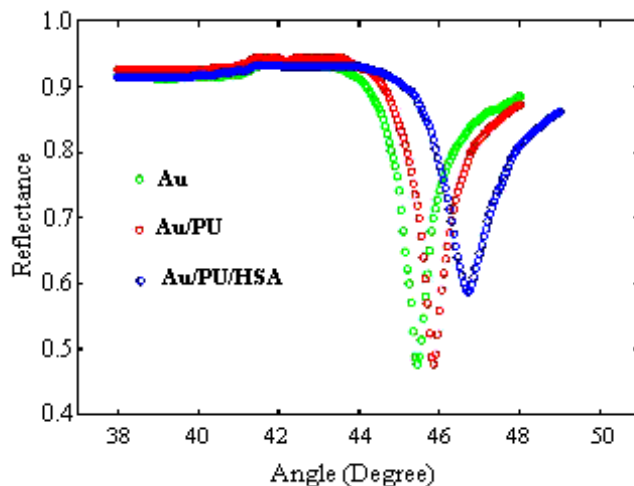
células se lavaron dos veces con CMF-PBS, se resuspendieron en MEM-FBS, y la suspensión se llevó luego a una concentración de 100 células.ml⁻¹.

Ensayos de citotoxicidad. Se colocaron 2 ml de la suspensión preparada en cada placa de cultivo (15 x 60 mm²) y se incubaron durante 5 horas para propiciar la adhesión celular. Luego de este período, se removió el medio de cultivo y se agregaron a las placas 5 ml del extracto puro, o bien, de la serie de soluciones (50, 25, 12,5 y 6,25 % v/v). Se agregó medio fresco (MEM-FBS, 5 ml) en la placa de las células CHO control. Cada concentración de los extractos estudiados se ensayó por triplicado. Las placas se colocaron en una incubadora a 37 °C con una atmósfera 5 % v/v de CO₂ y humedad saturada por 7 días, luego de lo cual se removió el medio y las colonias se mezclaron con un 10 % v/v de formaldehído, se llevó a una concentración final de 0,9 % p/v y se tiñó con Giemsa (**Anexo II.4**). Las colonias visibles en cada placa se contaron y se compararon con el número de colonias de la placa control de células CHO, midiendo la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro. El potencial citotóxico del material se expresó mediante un índice de citotoxicidad IC₅₀ (%), estimado por interpolación de las curvas de viabilidad celular, que representa la concentración de extracto que suprime la formación de colonias celulares un 50 % en comparación con el control.

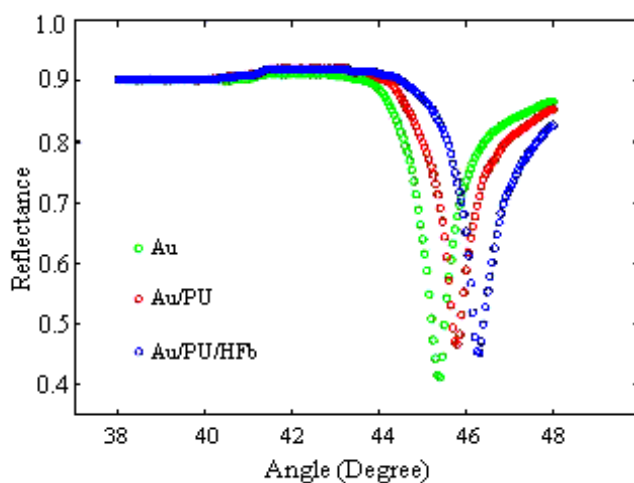
7.3 Resultados y Discusión

7.3.1 Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)

Se estudió la adsorción de HSA y HFb sobre las superficies de los filmes de PHH, PHL y PHD para examinar la extensión de la interacción superficial con proteínas presentes en sangre humana. Como se mencionó en la **Sección 7.1.1.1**, el tipo y cantidad de proteínas sanguíneas adsorbidas en la interfase biomaterial-sangre induce la posterior adsorción y activación plaquetaria sobre la superficie del biomaterial.



a)



b)

Figura 7.3: Espectros de SPR para filmes de PHL luego de contacto con **a)** seroalbúmina humana (HSA) y **b)** fibrinógeno humano (HFb). Concentración de HSA: 4,2 g.dl⁻¹, concentración de HFb: 0,24 g.dl⁻¹, Temperatura: 37 °C. Las concentraciones de proteínas y la temperatura son similares a las del cuerpo humano.

A partir del desplazamiento del ángulo de SPR (**Figura 7.3**) y una curva de calibración de concentración de proteínas, se calculó la cantidad de HSA y HFb adsorbida en la superficie de los filmes en función del tiempo (**Figura 7.4**). Los resultados muestran que los niveles de adsorción se estabilizaron luego de 200 segundos de exposición de los filmes a las soluciones proteicas. La cantidad final de HSA adsorbida fue de $31,4 \pm 1,94 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ en el caso de PHD, $23,1 \pm 1,5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ para PHH y

tan sólo de $0,82 \pm 0,012 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ para PHL. Por su parte, la cantidad de HFb adsorbido fue de $350 \pm 90 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ para el material PHH, $97,2 \pm 3,62 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ para PHD y de $60 \pm 7 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ para PHL. La mayor adsorción de HSA sobre filmes de PHH con respecto a los de PHL se podría relacionar con una mayor extensión de microdominios hidrofóbicos de PCL en la superficie del primero, lo que es consistente con una separación de fases más pronunciada. Sin embargo, PHD registra una adsorción de HSA mayor que PHH, presentando una menor separación de fases. En consecuencia, la microheterogeneidad de las superficies que presentan estructuras con microdominios hidrofóbicos e hidrofílicos, diferente carga superficial y microcristalinidad, torna compleja la elucidación de los factores que determinan el comportamiento biológico observado.

La elevada adsorción de HSA y la baja adsorción de HFb sobre las superficies de los filmes sugieren una baja adhesión y activación plaquetaria. Se encontró una relación de HSA/HFb adsorbido de 320 para PHD, 66 para PHH y 13 para PHL. Por lo tanto, a partir de estos ensayos, PHD podría presentar la menor adhesión y activación plaquetaria de los SPU de la Serie H.

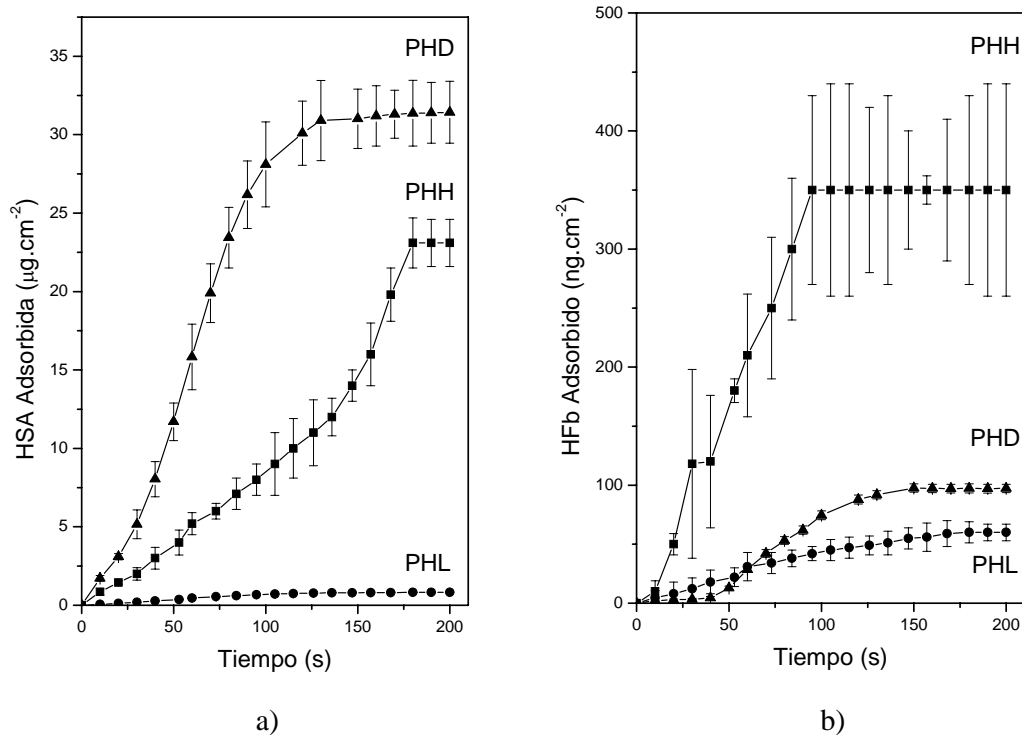


Figura 7.4: Adsorción de: a) seroalbúmina humana (HSA) y b) fibrinógeno humano (HFb), en filmes de PHH, PHL y PHD medida por SPR a 37 °C.

7.3.2 Adhesión plaquetaria

Como se mencionó en la **Sección 7.1.1.2**, las plaquetas juegan un rol clave en la trombosis, por lo que el éxito de un biomaterial en contacto con sangre dependerá, entre otros factores, de la reducción en la adhesión y activación plaquetaria sobre su superficie. Por este motivo, se investigó la adhesión plaquetaria en los SPU y el comportamiento de las plaquetas humanas sobre sus superficies.

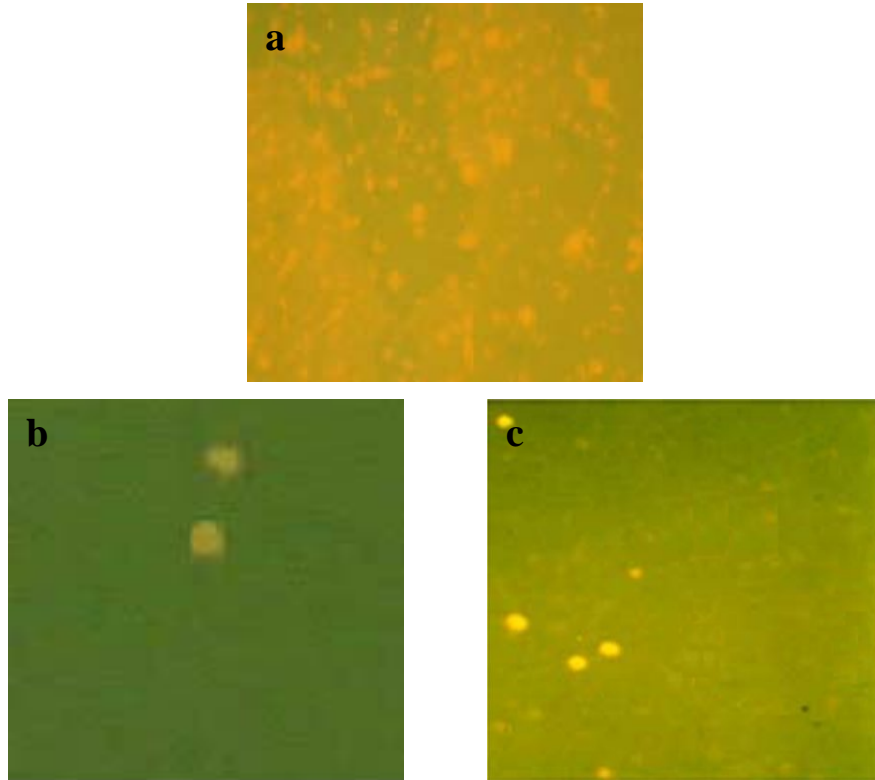


Figura 7.5: Imágenes de microscopía de epifluorescencia de plaquetas sobre a) vidrio y filmes de b) PHH y c) PHL luego de exposición a sangre humana (x 1000).

Las micrografías de epifluorescencia de las placas ELISA recubiertas con SPU y sin recubrir incubadas con sangre humana se muestran en la **Figura 7.5**. Las superficies de las placas ELISA sin recubrir favorecen la adhesión y activación plaquetaria con formación de trombos, mientras que las superficies recubiertas con SPU se muestran prácticamente libres de plaquetas.

El área cubierta por plaquetas observada por microscopía de epifluorescencia se utilizó como indicador de la trombogenicidad de las superficies. Tanto el número de plaquetas como sus cambios morfológicos contribuyen al área superficial cubierta del

sustrato. El cálculo del área cubierta de plaquetas por unidad de área proporciona un índice de adhesión y activación plaquetaria. La relación de plaquetas por unidad de área adheridas a las superficies de los sustratos recubiertos con SPU luego de la incubación se muestra en la **Figura 7.6**. Se emplearon vidrio y silicona de grado médico (Si-gm) como controles positivo y negativo, respectivamente. La relación de áreas cubiertas por plaquetas en los sustratos de SPU no fue significativamente mayor que la observada para los sustratos de silicona.

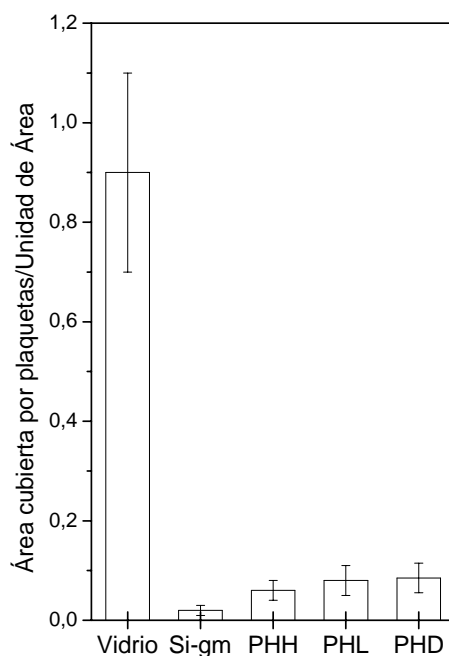


Figura 7.6: Relación de área cubierta por plaquetas por unidad de área ($100,000 \mu\text{m}^2$) sobre las superficies de los sustratos recubiertos con PHH, PHL y PHD luego de incubación con PRP.

La **Figura 7.7** muestra las micrográficas SEM de recubrimientos de SPU y de las placas ELISA sin recubrir como control positivo luego del contacto con sangre humana. La activación plaquetaria resultó marcadamente suprimida con los recubrimientos de PHH y PHL (**Figuras 7.7c y d**), lo que puede ser atribuido a la elevada adsorción de HSA de esas superficies.

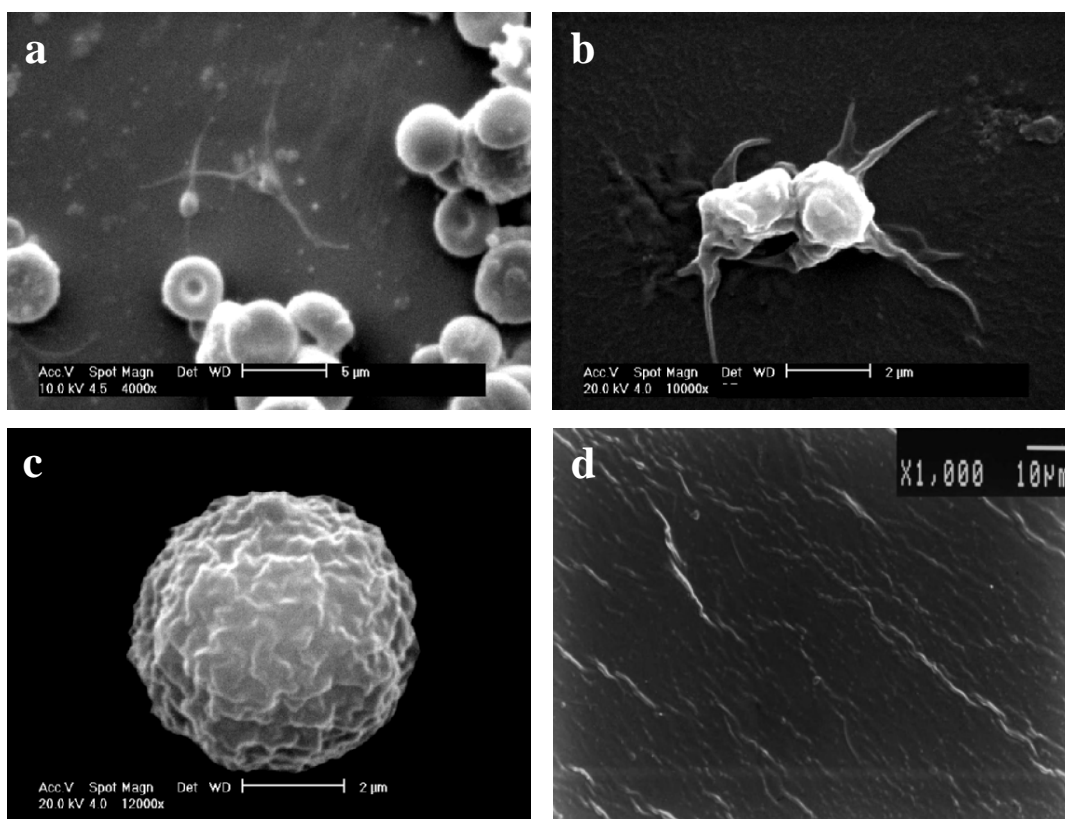


Figura 7.7: Micrografías SEM de plaquetas sanguíneas a) y b) activadas sobre superficies de vidrio, y sin activar sobre recubrimientos de c) PHH y d) PHL, luego de incubación con sangre humana a 37 °C por 15 minutos.

7.3.3 Expresión de CD62P

La **Figura 7.8** muestra el resultado en porcentaje de células positivas CD62P. Se observó una diferencia significativa en el porcentaje de plaquetas que expresaron CD62P en los recubrimientos de los SPU en comparación con las placas ELISA sin recubrir. El grado de activación plaquetaria en los SPU resultó del orden de la silicona de grado médico, característica que contribuye en forma complementaria a la potencial biocompatibilidad de estos materiales.

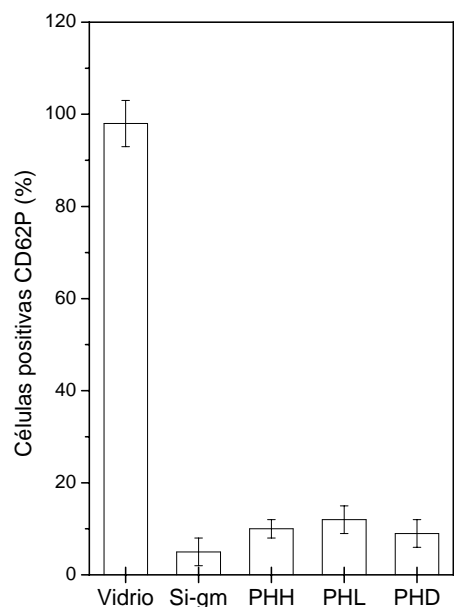


Figura 7.8: Expresión de plaquetas positivas CD62P (%). Vidrio y Si-gm son los controles positivo y negativo, respectivamente.

7.3.4 Cinética de formación de trombos y citotoxicidad

La cinética de formación de trombos luego de exposición de los recubrimientos de SPU a sangre humana se muestra en la **Figura 7.9**. La formación de trombos disminuyó drásticamente con los recubrimientos de SPU, de acuerdo con los resultados de adsorción de proteínas y adhesión y activación plaquetaria obtenidos anteriormente.

Finalmente, los niveles de citotoxicidad de las muestras de SPU resultaron bajos (**Figura 7.10**). Por lo tanto, la realización de estudios *in vivo* con modelos animales en un futuro cercano permitirá analizar el comportamiento de estos materiales con el medio biológico.

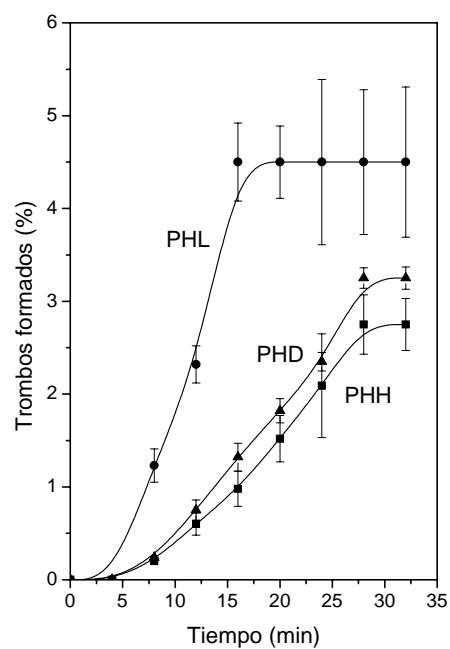


Figura 7.9: Cinética de formación de trombos sobre las superficies de filmes de PHL, PHH y PHD.

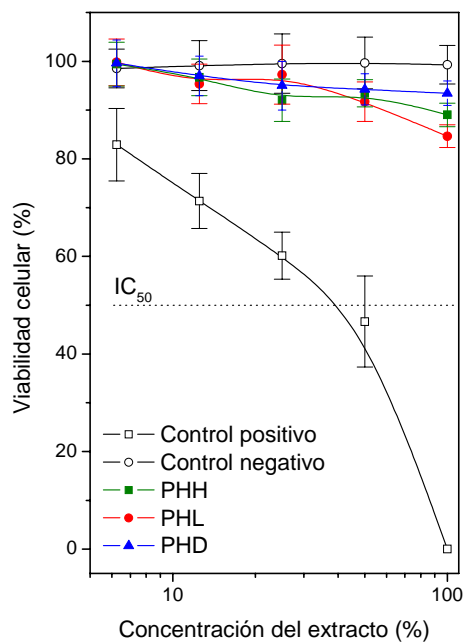


Figura 7.10: Citotoxicidad de los extractos de SPU, control negativo (UHMWPE) y control positivo (fenol) empleando células de ovario de Hamster Chino (CHO).

7.4 Conclusiones parciales

Las interacciones de un material con el medio biológico dependen fuertemente de la naturaleza de la interfase, y su estudio es fundamental para evaluar la respuesta del material en un medio específico. Por lo tanto, el diseño de materiales biocompatibles requiere del conocimiento y control de estas interacciones.

Los estudios efectuados permitieron determinar algunas propiedades biológicas *in vitro* de los poliuretanos de la Serie H. La técnica de resonancia de plasmón superficial resultó satisfactoria para estudiar la adsorción proteica sobre la superficie de los SPU, debido a la elevada sensibilidad del ángulo de resonancia con los cambios del índice de refracción en las proximidades de la superficie metálica, producidos por la adsorción de proteínas. Valores elevados de adsorción de HSA y bajos de HFb sobre las superficies de los SPU, así como baja adhesión y activación plaquetaria, baja formación de trombos y baja citotoxicidad, determinan a priori la buena biocompatibilidad de estos materiales, indicando su potencial viabilidad para aplicaciones en ingeniería de tejidos biológicos.

7.5 Referencias

- [1] Rathbun M.A., Craig R.G., Hanks C.T., Filisko F.E. Cytotoxicity of a Bis-GMA dental composite before and after leaching in organic solvents. *J Biomed Mater Res*, 25 (4): 443–457, **1991**.
- [2] Cascone M.G., Tricoli M., Cerrai P., Sbarbati Del Guerra R. Cell cultures in the biocompatibility study of synthetic materials. *Cytotechnology*, 11 (1): S137–S139, **1993**.
- [3] Pizzoferrato A., Ciapetti G., Stea S., Cenni E., Arciola C.R., Granchi D., Savarino L. Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clin Mater*, 15 (3): 173–190, **1994**.
- [4] Ratner B.D. Blood compatibility – a perspective. *J Biomater Sci Polym Ed*, 11 (11): 1107–1119, **2000**.
- [5] Brash J.L. Exploiting the current paradigm of blood-material interactions for the rational design of blood-compatible materials. *J Biomater Sci Polym Ed*, 11 (11): 1135–1146, **2000**.

- [6] Green R.J., Davies M.C., Roberts C.J., Tendler S.J.B. Competitive protein adsorption as observed by surface plasmon resonance. *Biomaterials*, 20 (4): 385–391, **1999**.
- [7] Green R.J., Frazier R.A., Shakesheff K.M., Davies M.C., Roberts C.J., Tendler S.J.B. Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials*, 21 (18): 1823–1835, **2000**.
- [8] Park W.H., Ha W.S., Ito H., Miyamoto T., Inagaki H., Noishiki Y. Relationships between antithrombogenicity and surface free energy of regenerated silk fibroin films. *Fibers Polym*, 2 (2): 58–63, **2001**.
- [9] Brash J.L. Role of plasma protein adsorption in the response of blood to foreign surfaces, en *Blood compatible materials and devices* (Sharma C.P., Szycher M. eds.), 3–24, Technomic, Lancaster, PA, **1991**.
- [10] Horbett T.A. Principles underlying the role of adsorbed plasma proteins in blood interactions with foreign materials. *Cardiovasc Pathol*, 2 (3): 137s–148s, **1993**.
- [11] Chinn J.A., Horbett T.A., Ratner B.D. Baboon fibrinogen adsorption and platelet adhesion to polymeric materials. *Thromb Haemost*, 65 (5): 608–617, **1991**.
- [12] Amiji M.M., Park K. Surface modification of polymeric biomaterials with poly(ethylene oxide), albumin, and heparin for reduced thrombogenicity. *J Biomat Sci Polym Ed*, 4 (3): 217–234, **1993**.
- [13] Clarke S., Davies M.C., Roberts C.J., Tendler S.J.B., Williams P.M., O’Byrne V., Lewis A.L., Russell J. Surface mobility of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-co-lauryl methacrylate polymers. *Langmuir*, 16 (11): 5116–5122, **2000**.
- [14] Corneillie S., Ngoc L.P., Schacht E., Davies M., Shard A., Green R., Denyer S., Wassall M., Whitfield H., Choong S. Polyethylene glycol-containing polyurethanes for biomedical applications. *Polym Int*, 46 (3): 251–259, **1998**.
- [15] Jung L.S., Campbell C.T., Chinowsky T.M., Mar M.N., Yee S.S. Quantitative interpretation of the response of surface plasmon resonance sensors to adsorbed films. *Langmuir*, 14 (19): 5636–5648, **1998**.

- [16] Frazier R.A., Davies M.C., Matthijs G., Roberts C.J., Schacht E., Tendler S.J.B., Williams P.M. *In situ* surface plasmon resonance analysis of dextran monolayer degradation by dextranase. *Langmuir*, 13 (26): 7115–7120, **1997**.
- [17] Kooyman R.P.H., Bruijn H.E., Eenink R.G., Greve J. Surface plasmon resonance as a bioanalytical tool. *J Mol Struct*, 218 (1-2): 345–350, **1990**.
- [18] Lechuga L.M., Calle A., Prieto F. Optical sensors based on evanescent field sensing. Part I. Surface plasmon resonance sensors. *Quim Anal*, 19 (1): 54–60, **2000**.
- [19] Colina A.J., Carballo T., Torres W. Hemostasia normal, en *Laboratorio Clínico* (Suardiá J., Cruz C., Colina A.J. eds), La Habana: Ecimed, 309–321, **2004**.
- [20] De Loughery T.G. Hemostasis and trombosis, 2da ed. Georgetown, Landes Bioscience, p. 217, **2004**.
- [21] Cardellá L., Hernández R., Upmann C., Vicedo A., Pérez A., Sierra S. et al. Bioquímica Médica. Tomo IV. Bioquímica especializada. La Habana: Ecimed, p. 1128, **2005**.
- [22] Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res*, 99 (12): 1293–1304, **2006**.
- [23] Pérez A.O., Castillo J.A., Cortázar T., Álvarez M., Douglas R., Díaz B. Participación plaquetaria en la hemostasia primaria. *Rev Cubana Invest Biomed*, 16 (2), **1997**.
- [24] Toros H., Castellanos R., Fernández-Brito J.E. La asociación de dislipidemia y trombosis en la inestabilización de la placa aterosclerótica. *Rev Cubana Invest Biomed*, 24 (3), **2005**.
- [25] Kleinschnitz C., Pozgajova M., Pham M., Bendszus M., Nieswandt B., Stoll G. Targeting platelets in acute experimental stroke. Impact of glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding. *Circulation*, 115 (17): 2323–2330, **2007**.
- [26] Arango-Dávila C., Escobar-Betancourt M., Cardona-Gómez G.P., Pimienta-Jiménez H. Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: Aspectos básicos y proyección a la clínica. *Rev Neurol*, 39 (2): 156–165, **2004**.

- [27] Ciccone A., Abraha I., Santilli I. Glycoprotein IIb-IIIa inhibitors for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev*, 4: CD005208, **2006**.
- [28] Shuaib A., Yang Y., Nakada M.T., Li Q., Yang T. Glycoprotein IIb/IIIa antagonist, murine 7E3 F(ab')₂, and tissue plasminogen activator in focal ischemia: Evaluation of efficacy and risk of hemorrhage with combination therapy. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22 (2): 215–222 **2002**.
- [29] Amiji M.M. Synthesis of anionic poly(ethylene glycol) derivative for chitosan surface modification in blood-contacting applications. *Carbohydr Polym*, 32 (3-4): 193–199, **1997**.
- [30] Harker L.A., Kelly A.B., Hanson S.R. Experimental arterial thrombosis in nonhuman primates. *Circulation*, 83 (6): IV41–IV55, **1991**.
- [31] Lin J-C., Ko T-M., Cooper S.L. Polyethylene surface sulfonation: surface characterization and platelet adhesion studies. *J Colloid Interface Sci*, 164 (1): 99–106, **1994**.
- [32] McEver R.P., Beckstead J.H., Moore K.L., Marshall-Carlson L., Bainton D.F. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest*, 84 (1): 92–99, **1989**.
- [33] Hamburger S.A., McEver R.P. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils. *Blood*, 75 (3): 550–554, **1990**.
- [34] Blankenberg S., Barboux S., Tiret L. Adhesion Molecules and Atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 170 (2): 191–203, **2003**.
- [35] <http://www.bago.com/BagoArg/Biblio/cardioweb473.htm>
- [36] Kennedy G., McLaren M., Belch J.J.F. Soluble P-selectin and P-selectin expression (CD62P) both reflect the same *in vivo* platelet activation. *J Thromb Haemost*, 1 Supplement 1 July, Abstract number: P1804, **2003**.
- [37] http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/18120.htm

[38] Lawrence W.H. Toxicological Evaluations in: Handbook of Biomaterials Evaluation, von Recum, A.F. (Ed.), Macmillan Publishing Company (1986). pp. 157-178.

[39] Homola J., Yee S.S., Gauglitz G. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sens Actuators B Chem*, 54 (1-2): 3–15, **1999**.

[40] CD62P (sP-selectin) ELISA KIT, *Trail R2/DR5 ELISA KIT*, 4: p. 1-6, **2008**.

[41] ISO 10993-5. Biological evaluation for medical devices tests for cytotoxicity in vitro methods international standards organization. Geneva: ISO, **1999**.

CAPÍTULO 8

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MATRICES POROSAS ELECTROHILADAS

8.1 Introducción

La tecnología de *electrospinning* constituye uno de los métodos de procesamiento de vanguardia que presenta mayores ventajas para la producción de nanofibras. La técnica tiene la habilidad única de producir nanofibras de diferentes materiales y geometrías, bajo costo, relativamente alta velocidad de producción y simplicidad en el diseño del equipamiento. Si bien el proceso se conoce desde 1934, no fue sino hasta mediados de la década del '90 que comenzó el interés en su uso para la obtención de fibras. Desde entonces, se han electrohilado muchos polímeros sintéticos y naturales, cerámicos y compuestos, para obtener fibras continuas de unos pocos nanómetros hasta algunos micrones que generan una membrana hilada no tejida altamente porosa [1]. Una vez optimizado el proceso, las fibras resultantes no requieren de una etapa extensa de purificación, como por ejemplo, los whiskers submicrométricos, las nanovarillas inorgánicas y los nanotubos de carbono.

La técnica de electrospinning constituye una vía sencilla y sumamente versátil para la producción de fibras de dimensiones micro y submicrométricas (por ejemplo, es posible ajustar las condiciones del proceso para obtener fibras de 3 nm a 10 μm). Sin embargo, es un proceso sumamente complejo que depende de numerosos parámetros, entre los que se encuentran:

- aspectos termodinámicos del solvente, tales como presión de vapor, temperatura de ebullición, momento dipolar, constante dieléctrica (**Tabla 8.1**) [2];
- aspectos termodinámicos del polímero, tales como peso molecular y distribución de pesos moleculares, temperatura de transición vítrea, cristalización y fusión, solubilidad del polímero en el solvente o mezcla de solventes;
- propiedades intrínsecas de la solución: viscosidad, concentración, conductividad eléctrica y tensión superficial;
- variables del proceso: voltaje aplicado, distancia entre la aguja y la placa colectora, velocidad de flujo de la solución;
- parámetros ambientales: temperatura de la solución y humedad en la cámara de electrospinning.

Resulta entonces importante determinar las propiedades intrínsecas de las soluciones y seleccionar apropiadamente los solventes y las condiciones experimentales para la formación de estructuras nanofibrosas.

Tabla 8.1: Propiedades de algunos solventes orgánicos empleados en electrospinning [2].

Solvente	Constante dieléctrica a 298 K, ϵ_r	Momento dipolar, μ (D)	Tensión Superficial, γ (mN.m ⁻¹)	Viscosidad a 298 K, η (mPa.s)	Temp. de ebullición, T_{eb} (°C)
Diclorometano (MC)	8,93	1,60	27,20	0,413	40
Acetona (Ac)	20,51	2,88	23,46	0,306	56
1,1,1,3,3,3-Hexafloro-2-propanol (HFIP)	16,70 ^a	3 – 5 ^b	-	1,650 ^a	58,2
Cloroformo	4,75	1,04	26,67	0,537	61
Tetrahidrofurano (THF)	7,43	1,75	26,40	0,456	65
2-propanol (IP)	19,29	1,56	20,93	2,038	82
Dimetilformamida (DMF)	37,24	3,82	35,20	0,794	153
Dimetilacetamida (DMAc)	37,81	3,70	36,40	1,927	165

^a Valor estimado a 293,2 K.

^b Valor calculado por métodos computacionales [3].

8.1.1 Fundamentos y aplicaciones de la técnica de *electrospinning*

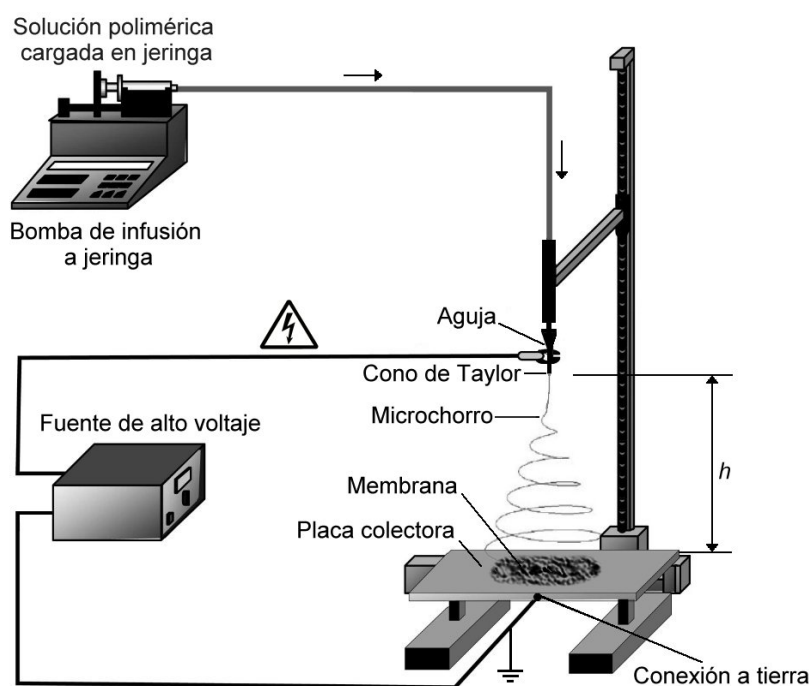


Figura 8.1: Equipo básico para la técnica de electrospinning.

El equipo básico, mostrado en la **Figura 8.1**, se compone de cuatro componentes: un reservorio (jeringa) de solución o material fundido que se conecta a un tubo capilar (aguja de diámetro interno de 400 μm a 900 μm), una bomba de infusión a jeringa que permite suministrar un flujo constante y controlado, una fuente de alto voltaje y un sistema colector, que en el caso más sencillo es una placa metálica conectada a tierra sobre la que se deposita el material electrohilado.

Cuando se aplica un voltaje del orden de 5 a 30 kV, la gota de la solución del polímero (o del fundido) pendiente de la aguja se electrifica fuertemente, y las cargas inducidas se distribuyen uniformemente sobre la superficie. En consecuencia, la gota experimenta dos tipos de fuerzas electrostáticas: una fuerza de repulsión entre las cargas superficiales y una fuerza coulombica ejercida por el campo eléctrico externo. Bajo la acción de estas interacciones, la gota se distorsiona tomando una forma cónica, lo cual se conoce como cono de Taylor. En estas condiciones, la tensión superficial y la fuerza eléctrica están en equilibrio. Una vez que la resistencia del campo eléctrico alcanza un determinado valor crítico, las fuerzas electrostáticas repulsivas pueden superar la tensión superficial de la solución de polímero. Esta situación es inestable, provocando la expulsión de un microchorro líquido cargado de la boquilla de la aguja. Este microchorro electrizado sufre estiramiento y movimientos tipo latigazo (*whipping*), dando lugar a la formación de hilos largos y delgados. A medida que el chorro líquido se deforma continuamente y se evapora el solvente (o solidifica el fundido), el diámetro de las fibras se reduce drásticamente. El estrechamiento del chorro durante el proceso de electrospinning se debe a la presencia de diversas inestabilidades asociadas con el microchorro electrizado. Particularmente, la regularidad y el diámetro final de las fibras dependerán fuertemente de la inestabilidad de *whipping*, que es el modo inestable por excelencia en electrospinning. La aparición de esta inestabilidad genera una flexión del microchorro. La obtención de fibras con pequeños diámetros se consigue gracias al estiramiento y aceleración del filamento fluido en la región de la inestabilidad.

Los componentes básicos del equipo de electrospinning pueden modificarse de muy diversas maneras, lo que confiere a esta técnica una enorme versatilidad. Por ejemplo, el empleo de un sistema dosificador de soluciones con múltiples jeringas logra la cobertura de un área mayor y aumenta la velocidad de producción de nanofibras. Empleando agujas coaxiales (concéntricas) se producen nanofibras compuestas, con un corazón de un material distinto que el de la capa superficial. El polímero interior puede incorporar un agente terapéutico de interés y formar parte de estructuras nanofibrosas

tipo núcleo-cáscara, donde el polímero exterior regula la liberación sostenida del agente. Por otro lado, también existen diversos diseños del sistema colector. Los colectores estacionarios dan como resultado nanofibras al azar mientras que los colectores en forma de mandriles, bobinas o marcos de metal producen nanofibras alineadas. El tipo de colector y su velocidad de rotación determinan el grado de alineación de las fibras. Esta alineación también puede obtenerse mediante el uso de determinados arreglos de electrodos.

Las fibras producidas resultan de gran interés no sólo debido a su diámetro nanométrico, sino también a su alta relación área/volumen (por ejemplo, las nanofibras con diámetros de 100 nm presentan un área superficial de $100 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) y al pequeño tamaño de poros obtenido por superposición de fibras. A partir de una adecuada elección del material a procesar se pueden obtener matrices con una combinación única de una elevada área superficial específica, flexibilidad, tenacidad y resistencia a la tracción. Esto permite numerosas aplicaciones tales como filtrado, catálisis, fibras compuestas para refuerzo de materiales, óptica y nanocables para aplicaciones en nanoelectrónica y dispositivos biomédicos, entre otras [4].

En el campo biomédico, las aplicaciones potenciales de las nanofibras son enormes y prometedoras [5-7]: matrices para regeneración y/o reparación de tejidos y órganos (injertos vasculares, nervios, piel, cartílago, huesos, músculos cardíacos, córneas, expansión y diferenciación de células madres), vectores para liberación de principios activos, dispositivos biomédicos biodegradables implantables, instrumentación y diagnóstico médico, tejidos de protección contra agentes infecciosos y medioambientales, aplicaciones dentales y cosméticas.

8.1.2 Morfología de los sistemas electrohilados

La viscosidad de la solución polimérica (que depende de la concentración del polímero) es uno de los principales determinantes de la morfología y tamaño de las fibras poliméricas electrohiladas. La relación entre la viscosidad y/o la concentración de la solución y las fibras obtenidas por electrospinning se estudió en un gran número de sistemas. Influyen también otros factores, como las características propias del polímero (peso molecular, polidispersidad, grado de ramificación), el tipo de solvente, la temperatura y la presencia de aditivos [8]. Todos estos factores juegan un papel vital en la iniciación y estabilización de una estructura fibrosa.

Dependiendo de las propiedades reológicas de la solución pueden producirse diferentes estructuras: perlas o gotas aisladas, fibras con perlas, y fibras. Para un polímero de un determinado peso molecular, el efecto de la concentración en la ruptura del microchorro de solución puede describirse por medio de dos concentraciones críticas, C_i y C_f , que definen la transición morfológica de una estructura que sólo contiene perlas dispersas a una estructura constituida solamente por fibras. A concentraciones de polímero por debajo de C_i , el enmarañamiento de cadenas en la solución (*entanglement*) es insuficiente y se produce una dispersión de gotas. En este caso, el chorro al final del cono de Taylor se separa en pequeños minichorros, y cada minichorro se desintegra en pequeñas gotas, fenómeno conocido como *electrospraying* [9]. Entre C_i y C_f , se obtiene una combinación de perlas y fibras, y cuando la concentración se aumenta por encima de C_f se producen fibras libres de perlas [10,11]. En soluciones muy concentradas, y por lo tanto muy viscosas, la gota se seca en la punta de la aguja por evaporación del solvente antes de que se pueda formar el microchorro, impidiendo el proceso de electrospinning [6].

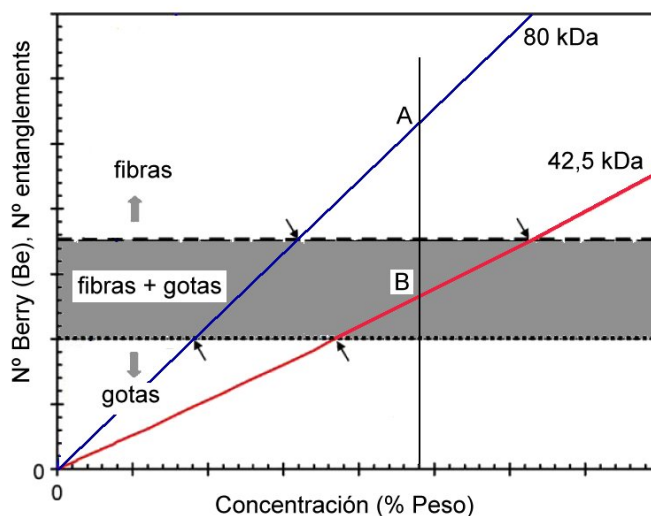


Figura 8.2: Diagrama cualitativo mostrando el efecto de C y Be en la morfología para electrospinning de PCL con distinto Mn.

El número de Berry (Be) es un indicador importante de la conformación molecular y juega un rol fundamental en la capacidad de una solución de formar fibras, y en el control del diámetro de las mismas. Este número adimensional es el producto de la viscosidad intrínseca del polímero en el solvente empleado y la concentración de la

solución polimérica ($Be = [\eta].C$). Para cada sistema existen intervalos de Be entre los cuales la conformación de las cadenas poliméricas en solución permite obtener diversas morfologías mencionadas anteriormente. En la **Figura 8.2** se muestra un ejemplo para dos policaprolactonas de diferente peso molecular.

8.1.3 Electrohilado de poliuretanos segmentados

Los poli(éster uretanos) segmentados y poli(éster uretano ureas) segmentados han sido poco empleados para la fabricación de soportes nanofibrosos por la técnica de electrospinning, lo que es sorprendente ya que estos polímeros comprenden una gran variedad de materiales con propiedades diseñadas a medida de la aplicación.

Hasta la fecha se han publicado muy pocos trabajos sobre la preparación de matrices poliuretánicas nanofibrosas para ingeniería de tejidos [12-15]. Sin embargo, existe una imperiosa necesidad de matrices biodegradables con las propiedades elastoméricas que presentan muchos de los tejidos blandos (por ejemplo, tejido cardiovascular, gastrointestinal y urinario). Los poliésteres comúnmente estudiados (PGA, PLA y PLGA) son relativamente rígidos y no presentan la elasticidad adecuada para estas aplicaciones. Las matrices elastoméricas pueden soportar los efectos de la tensión y carga cíclica, presentando una recuperación elástica con muy baja histéresis.

Recientemente se han desarrollado algunos sistemas poliuretánicos biocompatibles y biodegradables [16-18], aunque todavía no se encuentra completamente descrita la relación estructura-propiedades-procesamiento y la estabilidad hidrolítica en esos materiales.

En este capítulo se presenta la preparación y caracterización de matrices poliuretánicas micro/nanofibrosas de interés biomédico mediante la tecnología de electrospinning de soluciones. Los poliuretanos seleccionados fueron PHH y PHD, debido a su diferente composición, microestructura y propiedades mecánicas. Para la obtención de matrices con fibras uniformes, libres de defectos y con distribución de diámetros controlada, se prepararon soluciones de PHH y PHD de diferente concentración (C) empleando distintos solventes. Se variaron los siguientes parámetros del proceso: voltaje aplicado (V), velocidad de flujo de la solución (v) y distancia boquilla-placa colectora (h), y se investigó y discutió la morfología de las matrices electrohiladas obtenidas en cada caso.

8.2 Materiales y métodos

8.2.1 Materiales

Se emplearon dos poliuretanos de la Serie H: el poli(éster uretano urea) PHH y el poli(éster uretano) PHD. *N,N*-dimetilacetamida (DMAc), acetona (Ac), *N,N*-dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF), isopropanol (IP) y 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) se compraron a Aldrich Chemical Co. y se usaron como solventes sin previa purificación.

8.2.2 Preparación de matrices fibrosas

Las soluciones se prepararon disolviendo las muestras de SPU en diferentes solventes y mezclas de solventes, empleando agitación magnética a 80 °C. La concentración de las soluciones (*C*) se varió entre 5 y 40 % p/v, dependiendo del solvente empleado.

Las soluciones preparadas se cargaron en una jeringa de 10 ml conectada a un tubo de poliamida, en cuyo extremo se colocó una aguja hipodérmica de acero inoxidable con punta roma (diámetro interno = 838 μm). La velocidad de flujo se controló con una bomba de infusión a jeringa (ADOX S.A., Argentina, modelo Activa A22). Se empleó una fuente de alto voltaje (Gamma High Voltage Research Inc., USA, modelo ES30P). Todos los ensayos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (18 ± 2 °C) en una cámara con un sistema de extracción de vapores (**Figura 8.3**).

Las soluciones se electrohilaban empleando un voltaje $V = 10-20$ kV, una distancia entre la aguja y la placa colectora de aluminio $h = 10-20$ cm y una velocidad de flujo de solución $\nu = 0,5-3$ ml.h⁻¹. Las matrices obtenidas se secaron bajo vacío a temperatura ambiente para eliminar completamente el solvente residual y se guardaron en un desecador. La preparación de matrices electrohiladas a partir de soluciones en HFIP se realizó con la colaboración del Dr. Vinoy Thomas, responsable del Laboratorio del Center for Nanoscale Materials and Biointegration, University of Alabama at Birmingham (UAB), USA.



Figura 8.3: Equipo de electrospinning construido en nuestro laboratorio.

8.2.3 Caracterización de matrices fibrosas

8.2.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las muestras se metalizaron con Au/Pd y se examinaron empleando un microscopio electrónico de barrido (SEM, JEOL Ltd., USA) para observar la morfología de las matrices electrohiladas. La distribución de diámetros de fibras y el diámetro promedio de fibras se determinaron empleando un programa de análisis de imágenes (Image-Pro Plus versión 4.5.0.29).

8.2.3.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La determinación de las propiedades térmicas de las matrices electrohiladas (temperaturas de transición vítrea, temperaturas y entalpías de fusión y temperaturas y entalpías de cristalización) se llevó a cabo en un calorímetro Shimadzu DSC-50, empleando purga de nitrógeno y una velocidad de barrido de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, en el intervalo de temperaturas de $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $280\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los valores de T_g y X_c se determinaron siguiendo las mismas consideraciones empleadas en el **Capítulo 6**.

Los tratamientos térmicos con enfriamiento controlado se realizaron en un calorímetro Perkin-Elmer Pyris 1, empleando una velocidad de barrido de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ en calentamiento y de $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ en enfriamiento.

8.2.3.3 Ensayos de tracción uniaxial

Los ensayos se realizaron empleando probetas rectangulares de $35\text{ mm} \times 5\text{ mm} \times t\text{ mm}$ (donde $t = 1,25 \pm 0,15$) cortadas de las matrices electrohiladas de los SPU. Se utilizó una máquina universal de ensayos Instron Modelo 4467 con un extensómetro para elastómeros (Instron), una celda de carga de 100 N y una velocidad de travesa de $5\text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$. Los ensayos se efectuaron a temperatura ambiente ($18 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$).

8.3 Resultados y Discusión

8.3.1 Estudio del procesamiento de PHH

Los solventes DMF y DMAc se emplean normalmente en la síntesis de poliuretanos y en la preparación de soluciones poliuretánicas a partir de SPU precipitados, o directamente desde el reactor, para la obtención de filmes o recubrimientos mediante técnicas de colada de soluciones o recubrimientos por inmersión controlada. Como se observa en la **Tabla 8.1**, estos solventes poseen alta constante dieléctrica y momento dipolar. Hasta la fecha se han reportado pocos estudios que investiguen sistemáticamente el efecto de la constante dieléctrica y el momento dipolar de los solventes en el proceso de electrospinning [6]. Estas propiedades eléctricas favorecen el procesamiento, particularmente cuando el momento dipolar del solvente es alto.

En algunos trabajos se ha encontrado que la disminución de la tensión superficial de la solución polimérica permite la obtención de fibras uniformes sin gotas. Sin embargo, no necesariamente un solvente con baja tensión superficial es siempre adecuado para electrospinning.

Dado que la DMAc resultó un buen solvente de PHH y permitió la obtención de filmes poliuretánicos, se prepararon soluciones de PHH en un intervalo de $C = 5\text{-}40\%$ p/v empleando DMAc, y se electrohicieron a $V = 10\text{-}20\text{ kV}$, $h = 10\text{-}20\text{ cm}$ y $\upsilon = 0,5\text{-}3\text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$. La **Figura 8.4** muestra las morfologías obtenidas a partir de las

soluciones electrohiladas. En el caso de $C \leq 30$ % p/v sólo se obtuvo una proyección de gotas, indicando que en ese intervalo de concentraciones el enmarañamiento de cadenas poliméricas resultante no es suficiente para lograr la formación de fibras. Por otra parte, las soluciones con mayor concentración ($C \geq 40$ % p/v) no se pudieron electrohilar debido a que su elevada viscosidad impidió el procesamiento.

La **Figura 8.4a** muestra las microgotas casi esféricas, con diámetros de entre 1,08 y 5,47 μm , producidas debido al fenómeno de electrospraying, empleando una solución de $C = 30$ % p/v. Este comportamiento puede explicarse por la presencia de fuertes interacciones intermoleculares, aún en soluciones con buenos solventes. En polímeros altamente asociados por puente de hidrógeno, tales como poliuretanos, poli(uretano ureas) y poliamidas, el efecto de las interacciones entre cadenas poliméricas sobre la viscosidad de las soluciones no puede despreciarse [9]. Por lo tanto, aunque la DMAc resulta un solvente apropiado para la preparación de filmes de PHH, la presencia de puentes de hidrógeno entre cadenas afecta la viscosidad de la solución, incrementando la cohesividad e impidiendo el flujo continuo y extensional del chorro y, en consecuencia, el proceso de electrospinning.

Una alternativa para inducir la formación de fibras consiste en favorecer la evaporación durante el procesamiento de los materiales, lo que puede lograrse mediante el empleo de solventes adecuados y con bajo punto de ebullición. Al utilizar la mezcla de solventes DMAc/Ac 60/40 y una $C = 20$ % p/v se observó una morfología de gotas conectadas por fibras (*beaded fibers*) (**Figura 8.4b**). Si bien la acetona no es un buen solvente para estos polímeros, la mezcla DMAc/Ac permite su completa disolución y la introducción de una fracción de solvente más volátil que favorece la formación de fibras. Las soluciones de concentración mayor a 20 % p/v no se pudieron procesar debido a su elevada viscosidad. En este caso la calidad del solvente disminuye, y se incrementan considerablemente los efectos de las interacciones entre cadenas de polímeros en la viscosidad de las soluciones [9]. El empleo de soluciones de la misma concentración de SPU y DMF/THF 50/50 también produjo una morfología de fibras y gotas (**Figura 8.4c**). Al igual que en el caso anterior, el incremento en la concentración impidió el procesamiento de las soluciones debido a su elevada viscosidad. Con respecto al diámetro promedio de las fibras y al tamaño de las gotas, empleando DMAc/Ac 60/40 se obtuvieron fibras y gotas de 260 ± 50 nm y $3,00 \pm 1,25$ μm , respectivamente. Estos valores resultaron menores que los observados al emplear DMF/THF 50/50 (320 ± 130 nm y $4,61 \pm 1,71$ μm , respectivamente).

Si bien al emplear mezclas de solventes se formaron fibras, la presencia de gotas intercaladas indica que no se alcanzaron las condiciones óptimas para la formación de fibras uniformes. Esto se debe a que los valores de concentración crítica dependen no sólo de la composición química de las cadenas y las fuerzas de interacción presentes, sino también de las propiedades del solvente (o mezcla de solventes) empleado.

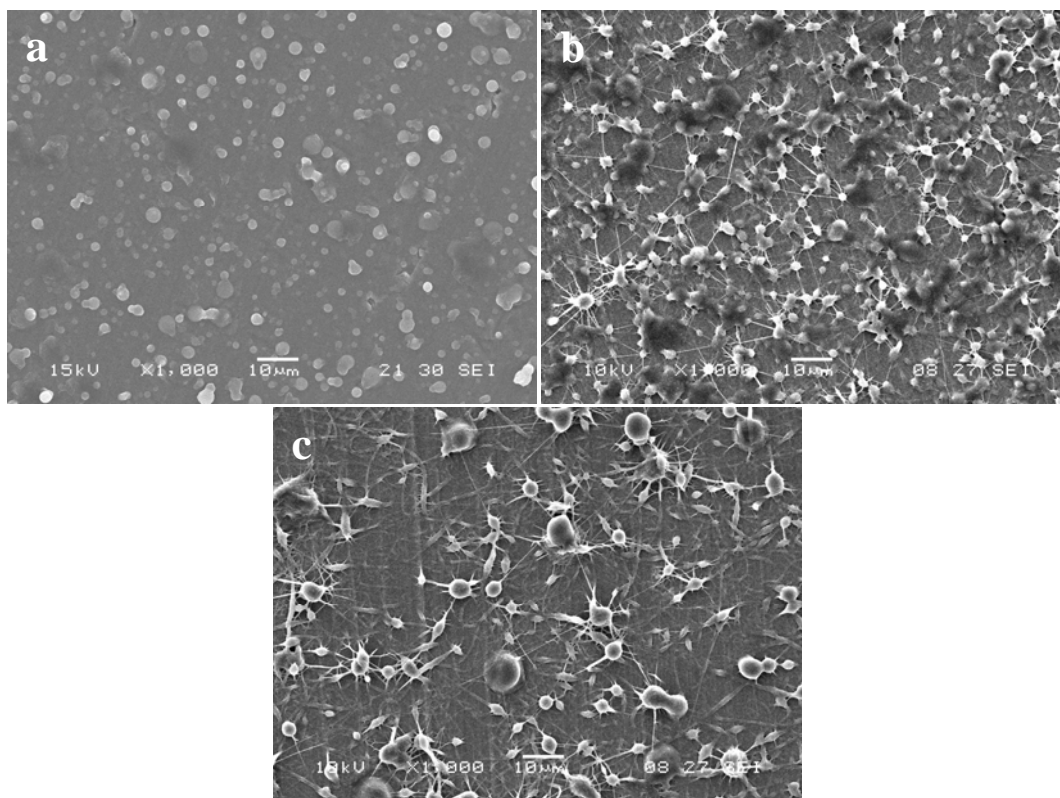
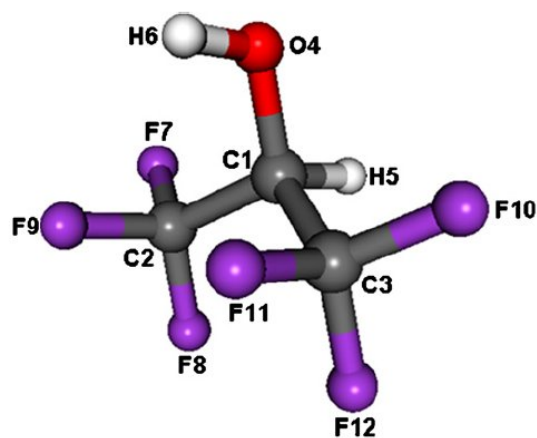


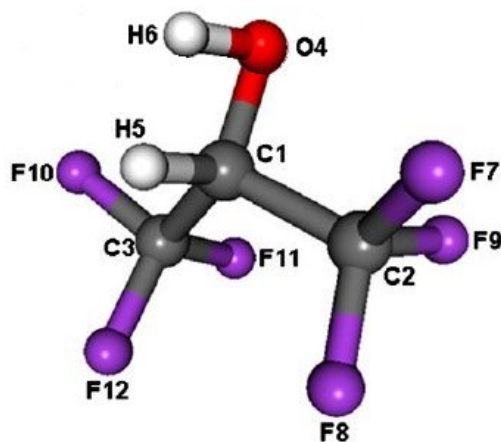
Figura 8.4: Micrografías SEM (x1000) de PHH electrohilado empleando $v = 1 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$, a) $C = 30 \%$ p/v en DMAc, $V = 12 \text{ kV}$, $h = 15 \text{ cm}$, b) $C = 20 \%$ p/v en DMAc/Ac (60/40), $V = 20 \text{ kV}$, $h = 15 \text{ cm}$, c) $C = 20 \%$ p/v en DMF/THF (50/50), $V = 20 \text{ kV}$, $h = 15 \text{ cm}$.

En literatura se encuentra reportada la obtención de matrices electrohiladas de polímeros altamente asociados por puente de hidrógeno empleando soluciones de HFIP. El HFIP es un solvente orgánico polar que presenta una fuerte capacidad de establecer enlaces vía puente de hidrógeno con grupos carbonilo aceptores. Esta característica le permite disolver una amplia variedad de sistemas poliméricos, incluyendo muchos que no son solubles en solventes orgánicos comunes, como por ejemplo poliamidas [19], poliuretanos, poli(uretano ureas) [20], poliacetales, poliacrilonitrilos, policetonas, poliésteres (como poli(ácido glicólico)), colágeno [21,22], gelatina y elastina [23,24], y

agregados peptídicos con láminas β . La manipulación del HFIP requiere mucho cuidado, ya que posee una elevada toxicidad y es considerablemente costoso. Como se comentó en los **Capítulos 5** y **6**, tanto los poli(uretano ureas) como los poliuretanos presentan redes tridimensionales donde las uniones vía puente de hidrógeno actúan como puntos de entrecruzamiento físico [25,26]. Estas interacciones proporcionan una alta energía cohesiva que contribuye a la presencia de un parámetro de solubilidad elevado. En consecuencia, la solubilidad de estos polímeros es posible solamente en solventes orgánicos altamente polares, tales como DMF, DMAc y HFIP.



antiperiplanar (*ap*)
 ángulo torsional H5-C1-O4-H6 = 180,08°



sinperiplanar (*sp*)
 ángulo torsional H5-C1-O4-H6 = $\sim 0^\circ$

Figura 8.5: Confórmeros del 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP).

Recientemente se estudió la influencia de la conformación y agregación de algunos alcoholes fluorados, entre los que se incluye el HFIP, en su capacidad donante de puente de hidrógeno [27]. El cambio de la conformación antiperiplanar (*ap*) a la conformación sinperiplanar (*sp*) del grupo H-C-O-H del HFIP (**Figura 8.5**) produce la disminución de la energía del orbital donante (σ_{OH}), lo que incrementa drásticamente el momento dipolar molecular. La conformación *sp*, que juega un rol crucial en el efecto solvolítico ejercido por el HFIP [27, 28], predomina en agregados moleculares enlazados por puente de hidrógeno (dímeros y trímeros).

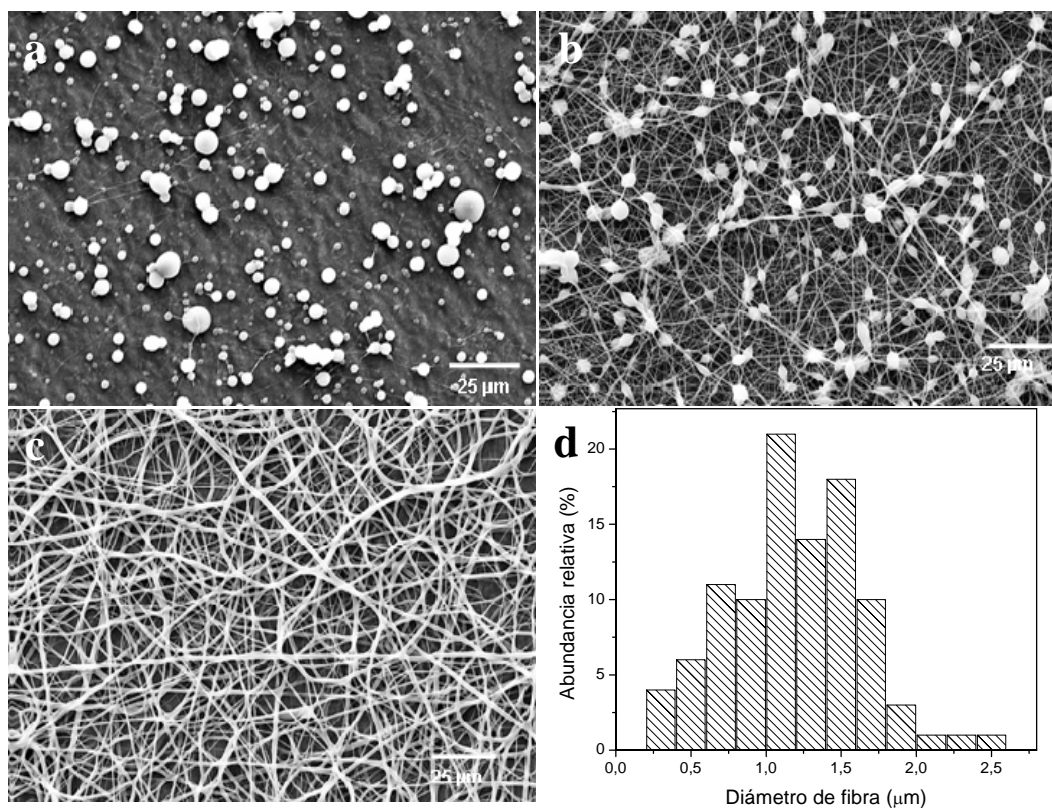


Figura 8.6: Micrografías SEM de PHH electrohilado a partir de soluciones de HFIP empleando $\upsilon = 1 \text{ ml.h}^{-1}$, $V = 15 \text{ kV}$, $h = 15 \text{ cm}$, a) $C = 10 \text{ \% p/v}$; b) $C = 15 \text{ \% p/v}$; c) $C = 20 \text{ \% p/v}$; d) distribución de diámetros de fibras correspondiente a la matriz mostrada en c).

Considerando las propiedades del HFIP, se exploró el comportamiento de PHH en este solvente. Se prepararon soluciones de $C = 5\text{-}20 \text{ \% p/v}$, empleando una intensidad de campo eléctrico de 1 kV.cm^{-1} y una velocidad de flujo de 1 ml.h^{-1} . Las soluciones diluidas de PHH ($C \leq 10 \text{ \% p/v}$) produjeron gotas conectadas por unas pocas fibras nanométricas (**Figura 8.6a**). Al incrementar la concentración a 15 \% p/v , la

solución aumenta su carácter viscoelástico, obteniéndose una morfología tipo “collar de perlas” (*bead-on-string*) (**Figura 8.6b**). Cuando la solución supera la concentración crítica de enmarañamiento, las cadenas poliméricas pueden formar fibras continuas. La morfología obtenida con una solución de PHH en HFIP 20 % p/v se puede observar en la **Figura 8.6c**. El diámetro promedio de fibras resultante para la matriz obtenida fue de $1,22 \pm 0,42 \mu\text{m}$, con una distribución de diámetro de fibras unimodal (**Figura 8.6d**).

La **Figura 8.7** muestra la morfología de las fibras de PHH obtenidas a partir de una solución de 20 % p/v en HFIP aplicando un voltaje de 10 kV. Este voltaje resultó insuficiente para la formación de fibras uniformes, como las mostradas en la **Figura 8.6c**, producidas con la aplicación de 15 kV. Por lo tanto, en estas condiciones de trabajo, la diferencia de potencial es un parámetro de procesamiento que ejerce un efecto importante en la morfología.

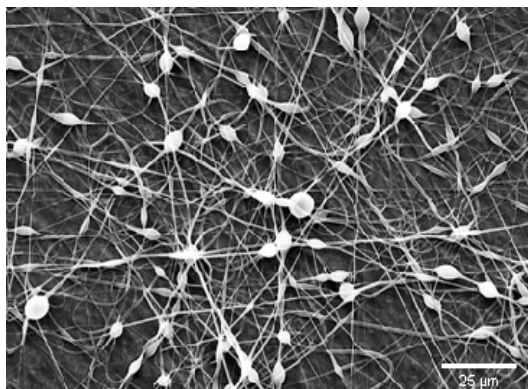


Figura 8.7: Micrografía SEM de PHH electrohilado a partir de una solución de HFIP de $C = 20 \%$ p/v, empleando $h = 15 \text{ cm}$, $v = 1 \text{ ml.h}^{-1}$ y $V = 10 \text{ kV}$.

Las **Figuras 8.8a** y **8.8b** muestran las micrografías SEM de las matrices obtenidas a partir de soluciones de PHH en HFIP con $C = 20 \%$ p/v empleando velocidades de flujo mayores (2 y 3 ml.h^{-1}). Si bien se espera que el diámetro de las fibras aumente con el incremento de la velocidad de flujo de la solución, los resultados obtenidos indican que se produjo el efecto opuesto. El aumento de velocidad de alimentación de 1 a 2 ml.h^{-1} mostró una importante disminución en el diámetro de fibras de $1,22 \pm 0,42 \mu\text{m}$ a $0,75 \pm 0,24 \mu\text{m}$. Esta disminución puede atribuirse al efecto que tiene la velocidad de flujo en la densidad de carga volumétrica y la corriente eléctrica de la solución polimérica [29]. En algunas soluciones poliméricas (polióxido de etileno, poliacetato de vinilo, poliácido acrílico y SPU) el aumento de la velocidad de flujo

produce un incremento de la corriente eléctrica [30], mientras que en otras, como por ejemplo PCL, genera una disminución de la corriente. En consecuencia, en el caso de los SPU, un aumento de la corriente eléctrica conduciría a una disminución del diámetro de fibra y de la densidad de carga superficial. Sin embargo, cuando la velocidad de flujo se incrementó a 3 ml.h^{-1} no se observó un cambio significativo en el diámetro de fibras ($0,70 \pm 0,20 \mu\text{m}$), cuya distribución se muestra en la **Figura 8.8c**. Este resultado es consistente con datos reportados en literatura para otros poli(éster uretano ureas) electrohilados [22]. La matriz mostrada en la **Figura 8.8b**, que presenta el menor diámetro promedio de fibras y la distribución más estrecha, se seleccionó para los estudios posteriores.

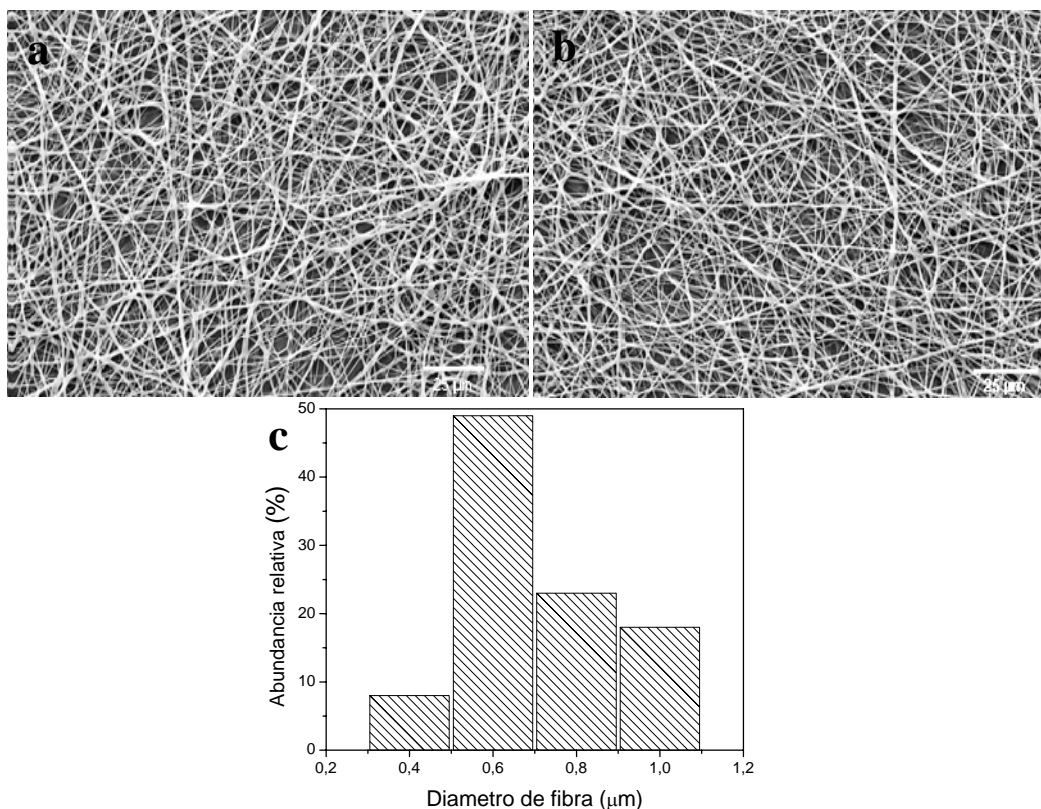


Figura 8.8: Micrografías SEM de PHH electrohilado a partir de soluciones de HFIP empleando $C = 20 \text{ \% p/v}$, $h = 15 \text{ cm}$, a) $v = 2 \text{ ml.h}^{-1}$, $V = 15 \text{ kV}$; b) $v = 3 \text{ ml.h}^{-1}$, $V = 15 \text{ kV}$; c) distribución de diámetros de fibras correspondiente a la matriz mostrada en b).

8.3.2 Estudio del procesamiento de PHD

Se prepararon soluciones de PHD empleando las mismas concentraciones y los mismos parámetros de procesamiento explorados en el caso de PHH. Independientemente de la concentración, las soluciones en DMAc, DMAc/Ac (60/40) y DMAc/IP (60/40) condujeron a la formación de gotas.

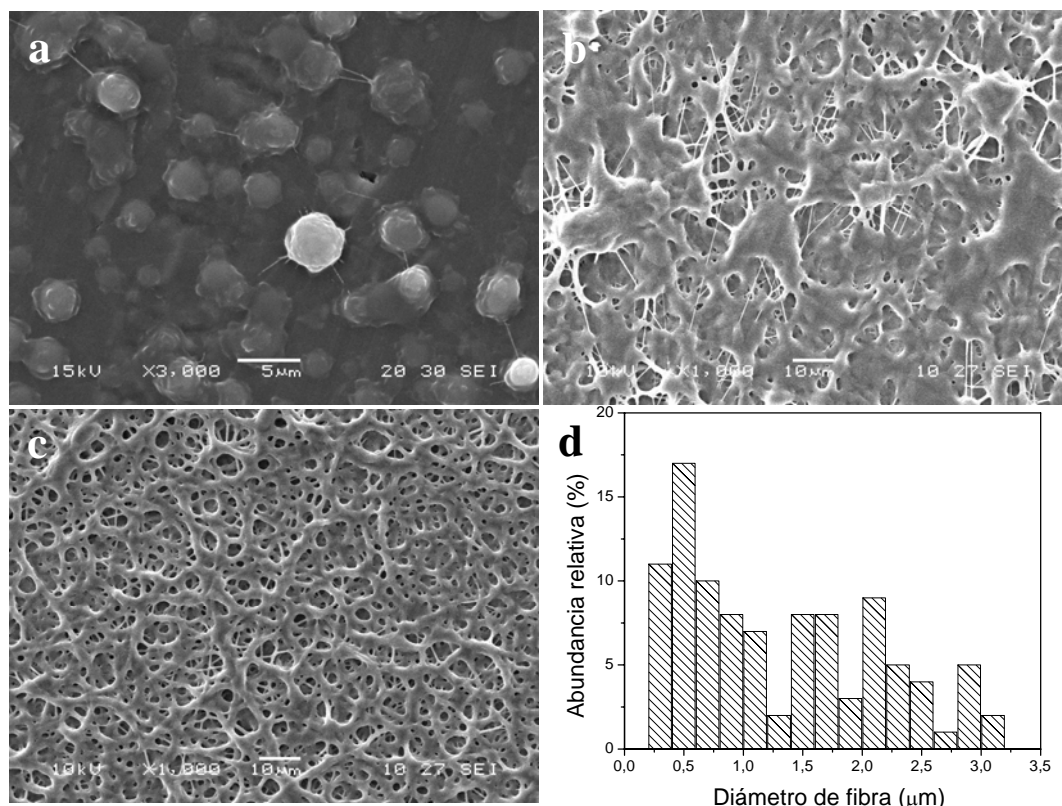


Figura 8.9: Micrografías SEM de PHD electrohilado a partir de soluciones de DMF/THF (50/50) empleando $v = 1 \text{ ml.h}^{-1}$, a) $C = 10 \text{ \% p/v}$, $V = 20 \text{ kV}$, $h = 15 \text{ cm}$; b) $C = 20 \text{ \% p/v}$, $V = 15 \text{ kV}$, $h = 10 \text{ cm}$; c) $C = 30 \text{ \% p/v}$, $V = 20 \text{ kV}$, $h = 15 \text{ cm}$; d) distribución de diámetros de fibras correspondiente a la matriz mostrada en c).

Sin embargo, al procesar las soluciones en DMF/THF (50/50) se observó claramente un efecto de la concentración en la morfología obtenida. Para el caso de $C = 10 \text{ \% p/v}$, a diferencia de los solventes anteriores, se observaron algunas gotas conectadas a través de fibras nanométricas (**Figura 8.9a**). Por ese motivo, la concentración de la solución se incrementó a 20 \% p/v , condición en la que se formaron gotas conectadas por fibras (**Figura 8.9b**). Finalmente, un aumento adicional de la concentración a un 30 \% p/v produjo una estructura fibrosa sin la presencia de gotas

(Figura 8.9c), con un diámetro promedio de fibras de $1,31 \pm 0,82 \mu\text{m}$. La distribución de diámetros de la Figura 8.9d muestra una distribución bimodal. Esta concentración de PHD favoreció el enmarañamiento de cadenas con una viscosidad suficiente para permitir el movimiento inducido por el campo eléctrico. Las soluciones de mayor concentración no se pudieron procesar debido a que su viscosidad resultó muy elevada.

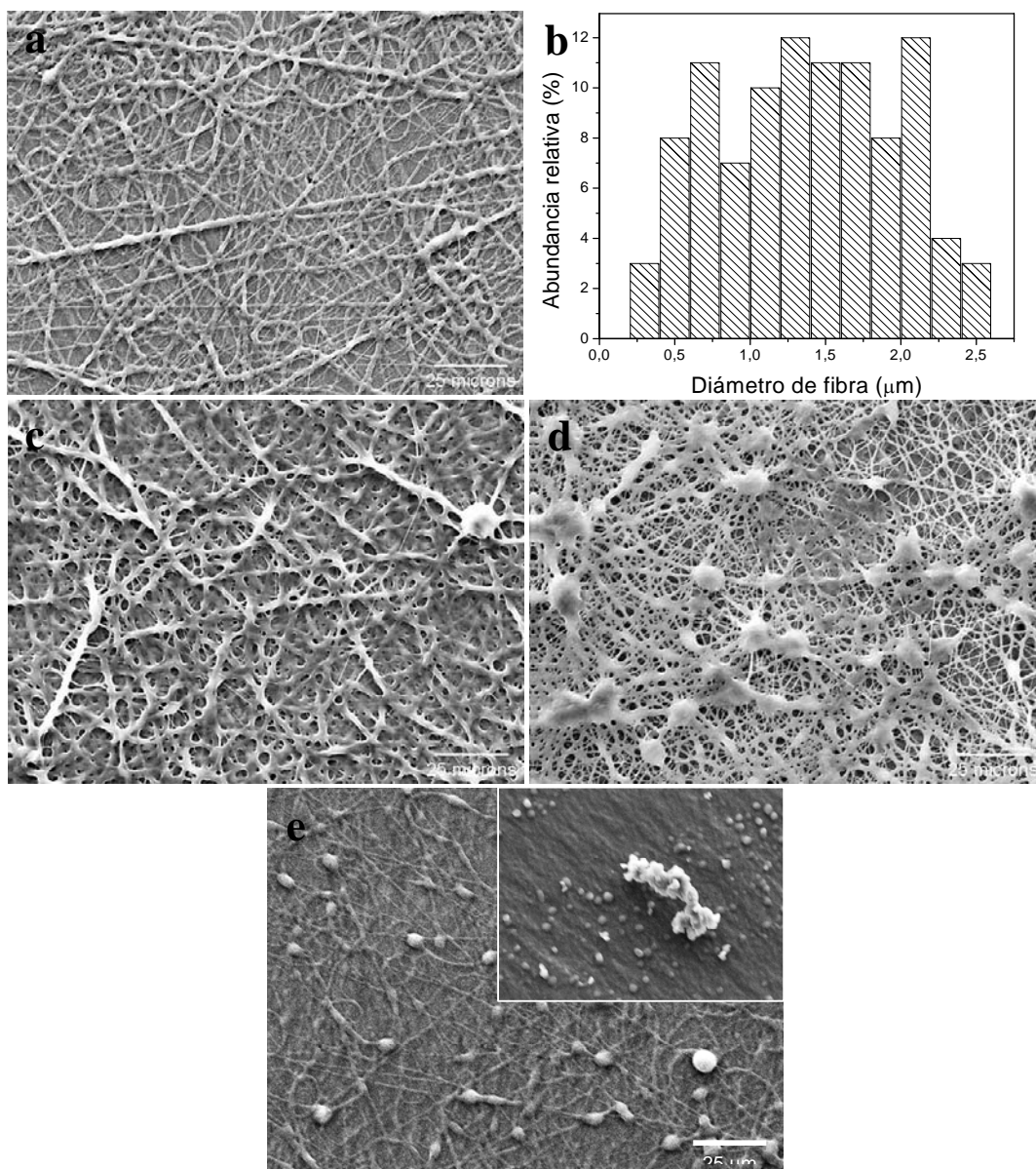


Figura 8.10: Micrografías SEM de PHD electrohilado a partir de soluciones de HFIP empleando $V = 15 \text{ kV}$, $h = 15 \text{ cm}$, a) $v = 0.5 \text{ ml.h}^{-1}$, $C = 20 \text{ \% p/v}$; b) distribución de diámetros de fibras correspondiente a la matriz mostrada en a); c) $v = 1 \text{ ml.h}^{-1}$, $C = 20 \text{ \% p/v}$; d) $v = 2 \text{ ml.h}^{-1}$, $C = 20 \text{ \% p/v}$; e) $v = 1 \text{ ml.h}^{-1}$, $C = 15 \text{ \% p/v}$. El recuadro en e) muestra la formación de gotas a $v = 1 \text{ ml.h}^{-1}$, $C = 10 \text{ \% p/v}$.

El poliuretano PHD también se procesó a partir de soluciones en HFIP. Las micrografías SEM de las matrices electrohiladas se muestran en la **Figura 8.10**. Inicialmente se trabajó con concentraciones menores a 20 % p/v, $V = 15$ kV, $v = 0,5$ ml.h⁻¹ y $h = 15$ cm, condiciones en las que resultó muy difícil obtener fibras continuas. Al incrementar la concentración de la solución a 20 % p/v se produjeron fibras, aunque las mismas no resultaron muy uniformes ($1,39 \pm 0,56$ μm), como puede apreciarse en la **Figura 8.10a**. La **Figura 8.10b** muestra una distribución de diámetro de fibras unimodal. Por su parte, las fibras obtenidas con $v = 1$ ml.h⁻¹ no completaron la evaporación del solvente antes de alcanzar la placa colectora, debido al carácter altamente viscoso que presenta PHD. La matriz resultante presentó puntos de unión entre las fibras (**Figura 8.10c**), y un aumento tanto del diámetro promedio como de su distribución ($1,54 \pm 0,71$ μm). El procesamiento de la solución de PHD con $C = 20$ % p/v y $v = 2$ ml.h⁻¹ produjo una mezcla de gotas y fibras, con diámetro promedio de fibras de $1,11 \pm 0,56$ μm, morfología similar a las formada con $C = 15$ % p/v (**Figuras 8.10d y 8.10e**). El electrohilado de soluciones de PHD con $C \leq 10$ % p/v, empleando las mismas condiciones de procesamiento, produjo sólo gotas esféricas ($4,49 \pm 0,71$ μm). La morfología resultante se muestra en el recuadro de la **Figura 8.10e**. Se seleccionó la matriz mostrada en la **Figura 8.10a** para los estudios posteriores, debido a que presentó fibras libres de gotas y una distribución más estrecha que la matriz de la **Figura 8.9c**.

8.3.3 Propiedades térmicas

Las propiedades térmicas de las matrices electrohiladas y de los filmes se resumen en la **Tabla 8.2**.

La matriz electrohilada de PHH (PHH_{mat}) exhibió una $T_{g,s}$ de $-59,2$ °C (primer barrido), valor ligeramente superior al obtenido para el film. Como se observa en la **Figura 8.11**, el termograma de PHH_{mat} presentó sólo un pico asociado a la fusión de dominios blandos, con temperatura y entalpía de fusión menores que las obtenidas para el film. La principal diferencia se mostró en la cristalinidad. El valor de X_c disminuyó en más de un 50 % con respecto al film. La morfología formada durante el electrohilado está determinada por los procesos de evaporación del solvente y elongación de la fibra que solidifica. En polímeros semicristalinos este proceso puede incluir también la formación de cristales. Es de esperar que un menor tiempo disponible para la cristalización genere cristales más pequeños, más defectuosos y menor cristalinidad

[31]. El proceso de solidificación durante la formación del film, por el contrario, es más lento y tiene lugar a temperatura más elevada, conduciendo a un material con un mayor grado de cristalinidad. Una mayor restricción en la movilidad de cadenas durante la solidificación rápida del material contribuyó a la notable disminución de la X_c . Además, PHH_{mat} mostró un pequeño pico de cristalización (1 J.g^{-1}) centrado en $32,8 \text{ }^\circ\text{C}$, cristales que fundieron a $50,1 \text{ }^\circ\text{C}$. PHH_{mat} presentó una $T_{g,h}$ ligeramente superior a la del film. También se observaron dos picos endotérmicos, atribuidos a la fusión de dominios duros con diferente grado de ordenamiento. Tanto $T_{m,h}$ como $\Delta H_{m,h}$ resultaron mayores a las encontradas para el film. Este comportamiento podría asociarse a la influencia del flujo elongacional establecido por la técnica de procesamiento, que permite la mayor interacción entre segmentos duros, de menor longitud que el segmento blando.

PHD_{mat} exhibió un comportamiento térmico muy diferente a PHH_{mat} , mostrando una $T_{g,s}$ y dos picos asociados a la fusión de dominios blandos a temperaturas superiores a las encontradas para el film (**Figura 8.11**). PHD_{mat} tampoco presentó transiciones de dominios duros. La cristalinidad de los dominios blandos de la matriz resultó más elevada que la del film, efecto poco encontrado en la literatura. La presencia de una fracción mayor de cristales con un mayor grado de ordenamiento resulta difícil de explicar en términos de la interacción intermolecular. Zhuo y colaboradores también observaron una mayor cristalinidad en nanofibras de SPU con memoria de forma, atribuyéndola a un tropismo positivo del segmento blando [32]. El entendimiento de este fenómeno requiere del empleo de otras técnicas tales como AFM y SAXS que permitan analizar detalladamente la morfología cristalina presente tanto en el film (*bulk*) como en las microfibras, donde la cristalización tiene lugar en condiciones y restricciones completamente diferentes.

Dado que las matrices presentaron dos picos asociados a la fusión de dominios blandos, se llevó a cabo un tratamiento térmico para analizar su efecto en la $T_{m,s}$. En el caso de PHH_{mat} se realizó un primer barrido desde temperatura ambiente hasta $70 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura que se mantuvo durante 5 minutos, observándose sólo una pequeña endoterma ($1,2 \text{ J.g}^{-1}$) a $48,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Un enfriamiento a velocidad controlada mostró una exoterma asignada a la cristalización ($T_{c,s} = -19,2 \text{ }^\circ\text{C}$ y $\Delta H_{m,s} = -9,2 \text{ J.g}^{-1}$). En un segundo barrido sólo se observó fusión a $15,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ($14,2 \text{ J.g}^{-1}$). También se realizó otro tratamiento térmico, efectuando un calentamiento a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 minutos, y luego se enfrió a velocidad controlada, observándose una exoterma de cristalización

($T_{c,s} = -19,2$ °C y $\Delta H_{c,s} = -6,2$ J.g⁻¹). En un segundo barrido la fusión ocurrió en dos picos (13,3 °C y 47,4 °C). Ambos tratamientos se realizaron también para PHD_{mat}, con resultados similares.

Por lo tanto, los tratamientos térmicos efectuados no permitieron la obtención de cristales de dominios blandos con mayor T_m , lo que puede atribuirse a la restricción que impone la estructura microfibrosa en la capacidad de reordenamiento y la formación de dominios cristalinos de mayor extensión.

Tabla 8.2: Propiedades térmicas de los filmes de SPU y sus matrices electrohiladas.

SPU	$T_{g,s}$ (°C)	$T_{m,s}$ (°C)	$\Delta H_{m,s}$ ^a (J.g ⁻¹)	X_c (%)	$T_{g,h}$ (°C)	$T_{m,h}$ (°C)	$\Delta H_{m,h}$ ^a (J.g ⁻¹)
PHH _{film}	-61,4	27,0 / 39,9	31,5	27,2	108,2	162,2 / 171,4	3,4
PHH _{mat}	-59,2	14,8	13,7	11,8	115,3	204,3 / 238,4	9,6
PHD _{film}	-53,2	26,6 / 39,3	29,8	26,4	-	-	-
PHD _{mat}	-50,4	39,5 / 49,0	42,6	37,7	-	-	-

^a Entalpía de fusión expresada por gramo de SPU.

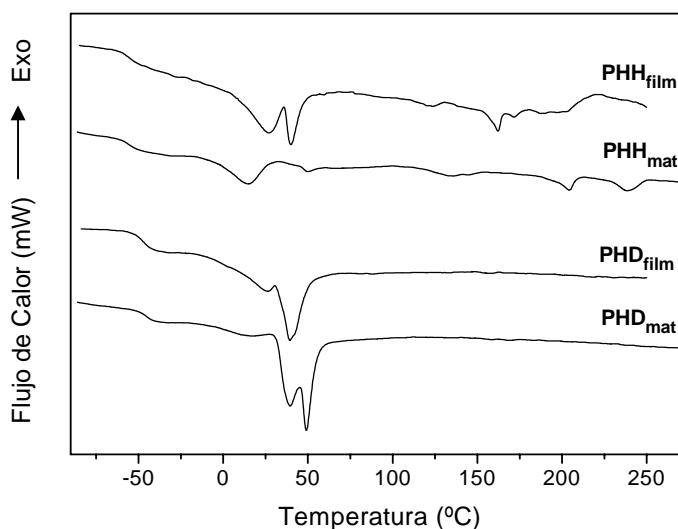


Figura 8.11: Termogramas de DSC de los filmes de SPU y sus matrices electrohiladas.

8.3.4 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las matrices electrohiladas, determinadas mediante ensayos de tracción uniaxial, se resumen en la **Tabla 8.3** junto a los resultados de los filmes, donde se muestran los valores de módulo de Young (E), tensión y deformación últimas (σ_u y ϵ_u , respectivamente) y tensión y deformación de fluencia (σ_y y ϵ_y , respectivamente). La **Figura 8.12a** muestra las curvas de tensión-deformación para las matrices electrohiladas.

Tabla 8.3: Propiedades mecánicas de los filmes de SPU y sus matrices electrohiladas.

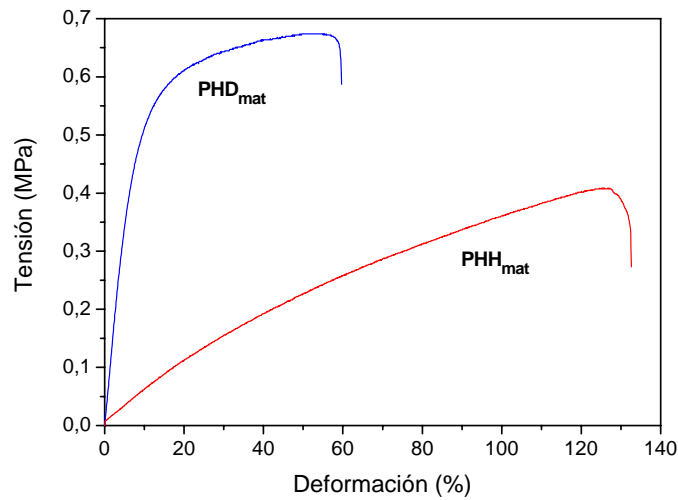
SPU	E (MPa)	σ_u (MPa)	ϵ_u (%)	σ_y (MPa)	ϵ_y (%)
PHH _{film}	16 ± 4	5,1 ± 0,3	469 ± 38	-	-
PHH _{mat}	0,5 ± 0,01	0,4 ± 0,02	124 ± 3,2	-	-
PHD _{film}	54 ± 4	6,9 ± 1,5	1006 ± 120	3,4 ± 0,9	19 ± 6
PHD _{mat}	7,5 ± 0,1	0,7 ± 0,01	54 ± 1,1	-	-

La diferente cristalinidad de PHD_{mat} y PHH_{mat} se reflejó en la rigidez de los materiales. PHD_{mat} exhibió un módulo de elasticidad 15 veces mayor y una deformación final 50 % menor. La morfología cristalina adoptada por ambos materiales, producto de la técnica de procesamiento y la estructura química del segmento duro, influyó notablemente en las propiedades mecánicas.

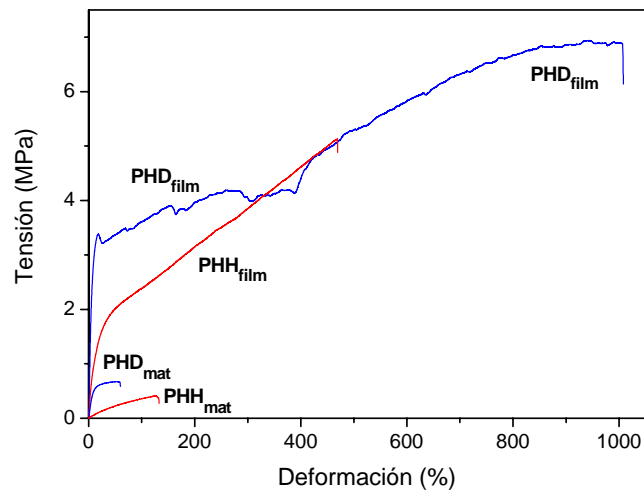
Como se observa en la **Tabla 8.3** y en la **Figura 8.12b** las propiedades mecánicas de las matrices resultaron inferiores a las de los filmes. Si bien existen muy pocos trabajos dedicados al estudio de matrices poliuretánicas electrohiladas, este comportamiento coincide con el observado en la literatura [20]. En una estructura fibrosa la capacidad de refuerzo de los dominios cristalinos resulta menor, y la presencia de defectos induce la rotura a menor grado de deformación.

En la regeneración de tejido de miocardio se requieren materiales elastoméricos blandos donde, según las simulaciones teóricas, el valor de módulo elástico se encuentre entre decenas de kPa y aproximadamente 1 MPa [33]. La naturaleza elastomérica necesaria para estas aplicaciones de carga cíclica es imposible de alcanzar con los poliésteres tradicionales. En particular PHH_{mat} reúne estas propiedades y resulta de

notable interés para el diseño de parches cardíacos que junto con el sembrado de cardiomiocitos restauren la funcionalidad de regiones de tejido infartadas.



a)



b)

Figura 8.12: Curvas de tensión-deformación en tracción de a) matrices electrohiladas, b) comparación de matrices electrohiladas con filmes.

8.4 Conclusiones parciales

La tecnología de electrospinning permitió la obtención de matrices micro/nanofibras de PHH y PHD.

Las propiedades de la solución (solvente y concentración de polímero) y los parámetros de procesamiento (campo eléctrico aplicado, distancia boquilla-colector y velocidad de flujo de la solución) se exploraron para la obtención de fibras uniformes sin gotas, analizando la influencia de estos parámetros de procesamiento en la morfología de las fibras obtenidas. El aumento de la concentración de las soluciones produjo un aumento de la viscosidad que imposibilitó el procesamiento. El empleo de HFIP resultó el más adecuado para electrohilar PHH y PHD.

Los tratamientos térmicos llevados a cabo en las matrices no permitieron la obtención de cristales de dominios blandos con mayor T_m , lo que puede atribuirse a la restricción que impone la estructura microfibrosa en la capacidad de reordenamiento y la formación de dominios cristalinos de mayor extensión. La morfología cristalina de nanofibras tiene lugar en condiciones y restricciones completamente diferentes del film, por lo que resulta complejo establecer un análisis comparativo.

El comportamiento mecánico de las matrices electrohiladas dependió de la morfología cristalina adoptada, determinada por las condiciones experimentales de la técnica de procesamiento y la estructura química del segmento duro.

Las matrices presentaron una estructura altamente porosa, con poros interconectados, microestructura apropiada para aplicaciones biomédicas tales como ingeniería de tejidos blandos y liberación controlada de principios activos, lo cual justifica el estudio de su comportamiento degradativo *in vitro*.

8.5 Referencias

- [1] Greiner A., Wendorff J.H. Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew Chem Int Ed*, 46 (30): 5670–5703, **2007**.
- [2] Lide. R.D. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 84th Edition. CRC Press LLC, Boca Raton, FL, USA, **2004**.
- [3] Schaal H., Häber T., Suhm M.A. Hydrogen bonding in 2-propanol. The effect of fluorination. *J Phys Chem A*, 104: 265–274, **2000**.
- [4] Ramakrishna S., Fujihara K., Teo W-E., Yong T., Ma Z., Ramaseshan R. Electrospun nanofibers: solving global issues. *Mater Today*, 9 (3): 40–50, **2006**.

- [5] Liao S., Li B., Ma Z., Wei H., Chan C., Ramakrishna S. Biomimetic electrospun nanofibers for tissue regeneration. *Biomed Mater*, 1 (3): R45, **2006**.
- [6] Pham Q.P., Sharma U., Mikos A.G. Electrospinning of Polymeric nanofibers for tissue engineering applications: A review. *Tissue Eng*, 12 (5): 1197–1211, **2006**.
- [7] Bhattarai S.R., Bhattarai N., Yi H.K., Hwang P.H., Cha D.I., Kim H.T. Novel biodegradable electrospun membrane: scaffold for tissue engineering. *Biomaterials*, 25 (13): 2595–2602, **2004**.
- [8] Hsu C-M., Electrospinning of poly(ϵ -caprolactone). Master of Science Thesis, Worcester Polytechnic Institute, **2003**.
- [9] Gupta P., Elkins C., Long T.E., Wilkes G.L. Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. *Polymer*, 46 (13): 4799–4810, **2005**.
- [10] Tao J., Shivkumar S. Molecular weight dependent structural regimes during the electrospinning of PVA. *Mater Letters*, 61 (11-12): 2325–2328, **2007**.
- [11] Shenoy S.L., Douglas Bates W., Frisch H.L, Wnek G.E. Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: good solvent, non-specific polymer–polymer interaction limit. *Polymer*, 46 (10): 3372–3384, **2005**.
- [12] Riboldi S.A., Sampaolesi M., Neuenschwander P., Cossu G., Mantero S. Electrospun degradable polyesterurethane membranes: potential scaffolds for skeletal muscle tissue engineering. *Biomaterials*, 26 (22): 4606–4615, **2005**.
- [13] Stankus J.J., Guan J., Fujimoto K., Wagner W.R. Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix. *Biomaterials*, 27 (5): 735–744, **2006**.
- [14] Kidoaki S., Kwon I.K., Matsuda T. Mesoscopic spatial designs of nano- and microfiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques. *Biomaterials*, 26 (1): 37–46, **2005**.

- [15] Kidoaki S., Kwon I.K., Matsuda T. Structural features and mechanical properties of *in situ*-bonded meshes of segmented polyurethane electrospun from mixed solvents. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, 76 (1): 219–229, **2006**.
- [16] Henry J.A., Burugapalli K., Neuenschwander P., Pandit A. Structural variants of biodegradable polyesterurethane *in vivo* evoke a cellular and angiogenic response that is dictated by architecture. *Acta Biomater*, 5 (1): 29–42, **2009**.
- [17] Gunatillake P.A., Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater*, 5: 1–16, **2003**.
- [18] Guelcher S.A. Biodegradable Polyurethanes: Synthesis and Applications in Regenerative Medicine. *Tissue Eng Part B*, 14 (1): 3–17, **2008**.
- [19] Jose M.V., Steinert B.W., Thomas V., Dean D.R., Abdalla M.A., Price G., Janowski G.M. Morphology and mechanical properties of Nylon 6/MWNT nanofibers. *Polymer*, 48 (4): 1096–1104, **2007**.
- [20] Stankus J.J., Guan J., Wagner W.R. Fabrication of biodegradable elastomeric scaffolds with sub-micron morphologies. *J Biomed Mater Res Part A*, 70A (4): 603–614, **2004**.
- [21] Matthews J.A., Wnek G.E., Simpson D.G., Bowlin G.L. Electrospinning of Collagen Nanofibers. *Biomacromolecules*, 3 (2): 232–238, **2002**.
- [22] Thomas V., Dean D.R., Jose M.V., Mathew B., Chowdhury S., Vohra Y.K. Nanostructured Biocomposite Scaffolds Based on Collagen Coelectrospun with Nanohydroxyapatite. *Biomacromolecules*, 8 (2): 631–637, **2007**.
- [23] Thomas V., Zhang X., Catledge S.A., Vohra Y.K. Functionally graded electrospun scaffolds with tunable mechanical properties for vascular tissue regeneration. *Biomed Mater*, 2 (4): 224–232, **2007**.
- [24] Li M., Mondrinos M.J., Gandhi M.R., Ko F.K., Weiss A.S., Lelkes P.I. Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials*, 26 (30): 5999–6008, **2005**.

- [25] Thomas V., Jayabalan M. Studies on the effect of virtual crosslinking on the hydrolytic stability of novel aliphatic polyurethane ureas for blood contact applications. *J Biomed Mater Res Part A*, 56A (1): 144–157, **2001**.
- [26] Thomas V., Jayabalan M. The effect of virtual cross linking on the oxidative stability and lipid uptake of aliphatic poly(urethane urea). *Biomaterials*, 23 (1): 273–282, **2002**.
- [27] Berkessel A., Adrio J.A., Hüttenhain D., Neudörfl J.M. Unveiling the “booster effect” of fluorinated alcohol solvents: Aggregation-induced conformational changes and cooperatively enhanced H-bonding. *J American Chem Soc*, 128 (26): 8421–8426, **2006**.
- [28] Czarnik-Matusiewicz B., Pilorz S., Bieńko D., Michalska D. Molecular and electronic structures, infrared spectra, and vibrational assignment for ap and sc conformers of hexafluoro-iso-propanol. *Vibrational Spectroscopy*, 47(1): 44–52, **2008**.
- [29] Nasir M., Matsumoto H., Danno T., Minagawa M., Irisawa T., Shioya M., Tanioka A. Control of diameter, morphology, and structure of PVDF nanofiber fabricated by electrospray deposition. *J Polym Sci Part B: Polym Phys*, 44 (5): 779–786, **2006**.
- [30] Theron S.A., Zussman E., Yarin A.L. Experimental investigation of the governing parameters in the electrospinning of polymer solutions. *Polymer*, 45 (6): 2017–2030, **2004**.
- [31] Dhanalakshmi M., Jog J.P. Preparation and characterization of electrospun fibers of Nylon 11. *eXPRESS Polym Lett*, 2 (8): 540–545, **2008**.
- [32] Zhuo H., Hu J., Chen S. Electrospun polyurethane nanofibres having shape memory effect. *Mater Letters*, 62 (14): 2074–2076, **2008**.
- [33] Chen Q.Z., Bismarck A., Hansen U., Junaid S., Tran M.Q., Harding S.E., Ali N.N., Boccaccini A.R. Characterisation of a soft elastomer poly(glycerol sebacate) designed to match the mechanical properties of myocardial tissue. *Biomaterials*, 29 (1): 47–57, **2008**.

CAPÍTULO 9

ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD HIDROLÍTICA Y OXIDATIVA DE MATRICES Y FILMES POLIURETÁNICOS

9.1 Introducción

El término biodegradación involucra la interacción entre un material y un medio biológico, que puede comprender mamíferos o microorganismos. La biodegradación, en el contexto de la interacción entre un polímero y un organismo vivo, incluye todos los procesos que llevan a la degradación del material, ya sean hidrolíticos, catalizados por ácidos y bases, oxidativos o enzimáticos.

La biodegradabilidad puede evaluarse mediante estudios *in vitro*, empleando diferentes protocolos, los cuales permiten inferir el comportamiento *in vivo*, antes de la realización de los costosos y extensos estudios en modelo animal.

9.1.1 Biodegradación de polímeros sintéticos

Los polímeros biodegradables pueden sufrir procesos de degradación superficial y en masa. En el caso de los polímeros que se degradan en masa, la velocidad de penetración de agua en la matriz es mayor que la velocidad de degradación del polímero. El proceso es homogéneo, en el cual la degradación ocurre a una velocidad uniforme a través de la matriz polimérica. Por lo contrario, en los polímeros que sufren degradación superficial, la velocidad de penetración de agua en la matriz es menor que la velocidad de degradación del polímero. Este proceso es heterogéneo y se conoce como bioerosión, donde la degradación se encuentra confinada a una fina capa superficial de polímero.

Existen varios factores que afectan la velocidad de degradación:

a) Presencia de enlaces susceptibles a hidrólisis enzimática: la velocidad de degradación enzimática (facilidad de formación del complejo enzima-sustrato) depende de la estructura en las vecindades del sitio susceptible a degradación, y también de la estructura tridimensional del polímero (accesibilidad del sustrato).

b) Entrecruzamiento y solubilidad en agua: la degradación es más lenta en polímeros insolubles, y depende del grado de hinchamiento. A mayor grado de entrecruzamiento, el ingreso de agua se ve más dificultado, por lo que se observa una menor velocidad de degradación. A su vez, cuanto más hidrofílico es el polímero, mayor es su velocidad de degradación.

c) Peso molecular: a menor peso molecular la velocidad de degradación es mayor. Los polímeros con grupos terminales polares y bajo peso molecular son más hidrofílicos que los correspondientes polímeros con alto peso molecular.

d) Morfología cristalina: La degradación se inicia en las regiones amorfas del material, y cuando éstas se han hidrolizado comienza la degradación de las regiones cristalinas. La velocidad de degradación del polímero depende del grado de permeabilidad del mismo. Dado que las regiones cristalinas presentan un empaquetamiento compacto, la penetración de agua, y por lo tanto, la degradación de las cadenas poliméricas, ocurren mucho más lentamente que en las regiones amorfas. Por ello, polímeros semicristalinos se degradan más lentamente que polímeros amorfos. Sin embargo, durante la degradación de las regiones amorfas del polímero, algunas regiones cristalinas también pueden ser hidrolizadas. Asimismo, algunas cadenas poliméricas no degradadas en las regiones amorfas pueden reorganizarse, resultando un aumento de la cristalinidad del material.

e) Temperatura de transición vítrea: la T_g refleja la movilidad de las cadenas poliméricas, que determinan la facilidad de la difusión de agua y del ataque químico. Si la T_g de un material es menor que la temperatura fisiológica, las moléculas individuales tienen mayor movilidad y resultan más susceptibles al ataque químico, o cuando sea posible, enzimático, lo que produce una degradación más rápida. Si la T_g es mayor a la temperatura corporal, las moléculas individuales poseen una menor movilidad, y la degradación es más lenta.

9.1.2 Degradación de poliuretanos

La degradación de poliuretanos, como la de otros materiales, depende del tipo, lugar y sollicitación mecánica del implante, así como de su estructura química. Los tiempos de degradación de los poliuretanos pueden variar enormemente de acuerdo a su composición. Los poliuretanos biorreabsorbibles están diseñados para sufrir degradación hidrolítica, oxidativa o enzimática *in vivo*, dando lugar a productos de descomposición no tóxicos.

En general, los poli(carbonato uretanos), poli(éter uretano ureas) y poli(éter uretano dialquilsiloxanos) son más estables *in vivo* que poli(éter uretanos) o poli(éster uretanos). La degradación *in vivo* de poliuretanos ocurre principalmente mediante ruptura hidrolítica de enlaces éster y uretano [1], y ataque oxidativo y deterioro por

factores ambientales en el caso de enlaces éter [2], acelerados por la acción de enzimas [3], peróxidos, actividad catalítica de iones metálicos, formación de grupos carboxílicos, captación de lípidos, calcificación y sometimiento a carga de los implantes. Los macrófagos pueden liberar enzimas hidrolasas en los sitios de implante a partir de sus lisosomas [4], así como sustancias hidrolíticas y oxidativas (enzimas, anión superóxido, radical hidroxilo, H_2O_2 , ácidos, hipoclorito, etc.) [5] como parte de la respuesta inflamatoria del organismo. La concentración local de estas especies químicas puede ser muy elevada en la superficie polimérica, y sus efectos podrían acelerarse por la liberación de productos de degradación. A pesar de que algunos estudios celulares *in vitro* sugieren que las esterasas contribuyen a la ruptura hidrolítica de poli(éster uretanos), hasta el momento, su degradación *in vivo* no ha sido relacionada directamente con enzimas hidrolasas [6].

Además de la química superficial, la diferente topografía de las superficies de los poliuretanos también puede contribuir a su degradabilidad, así como la activación de macrófagos [7]. Por ejemplo, la actividad enzimática en macrófagos es mayor en membranas poliuretánicas suaves e hidrofóbicas que en membranas porosas e hidrofílicas [8]. En algunos trabajos se llevaron a cabo modificaciones en la superficie de poliuretanos para alterar su bioestabilidad, introduciendo el uso de copolímeros anfífilos como aditivos, sin alterar la química del resto del material. Ward y colaboradores [9] introdujeron un oligómero siliconado como modificador superficial que disminuye la susceptibilidad a oxidación. Santerre y colaboradores desarrollaron una familia de modificadores superficiales fluorados, con capacidad de reducir la extensión de la hidrólisis [10,11]. Más recientemente, estos polímeros se emplearon para liberar antioxidantes en la superficie de poliuretanos con el objeto de minimizar la hidrólisis y reducir la oxidación [12]. Del mismo modo, se están explorando estrategias para obtener poliuretanos con degradabilidad controlada para la liberación de fármacos y otras aplicaciones [13].

9.1.2.1 Efecto de la estructura de los segmentos blandos

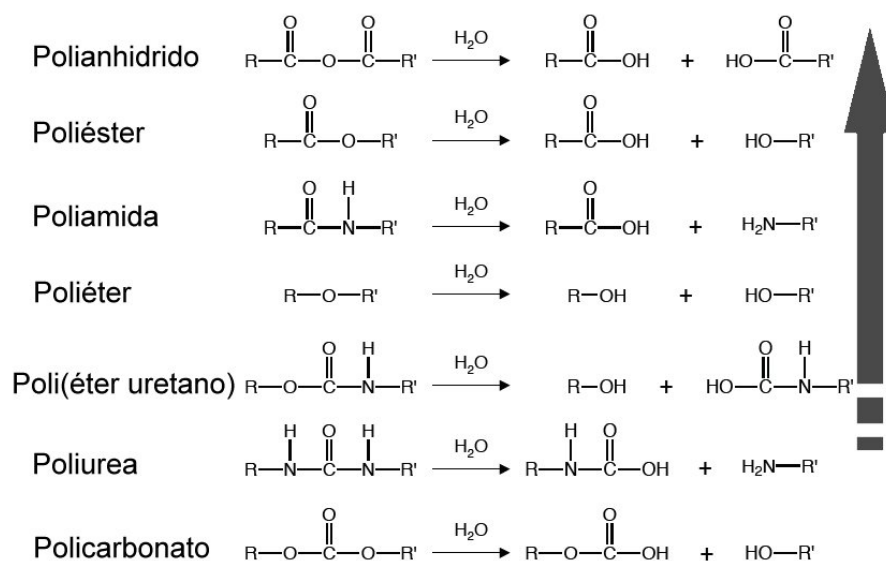
La composición del segmento blando del SPU se utiliza comúnmente para modificar los tiempos de degradación del material. En aplicaciones temporales se suelen emplear poli(éster uretanos), formulados principalmente a partir de poliésteres de ϵ -caprolactona [14-17] y ácidos láctico y glicólico [18,19], debido a su degradación

hidrolítica *in vivo*. Los cambios en la estructura física y química afectan su biodegradabilidad. Así, la velocidad de hidrólisis no enzimática de polímeros de α -hidroxiácidos es mayor que la de β , γ , δ y ε -hidroxiácidos. De este modo, la PCL proporciona una cierta estabilidad hidrolítica y propiedades mecánicas elastoméricas en SPU. Pitt y colaboradores estudiaron la degradación *in vitro* e *in vivo* de PCL [20]. En este trabajo, se encontró que las velocidades de degradación en medio salino a 40 °C y empleando conejos como modelo animal resultaron similares, sugiriendo fuertemente que no hay enzimas involucradas en el proceso degradativo *in vivo*.

El empleo de copolímeros en bloque como segmentos blandos se utiliza como estrategia para obtener cristalinidad y velocidad de degradación intermedias. Utilizando copolímeros de poliésteres hidrofóbicos, como PCL, con polímeros hidrofílicos, como polióxido de etileno (PEO), pueden obtenerse materiales con velocidad de degradación y adhesión celular mayores a las de SPU con segmentos blandos de PCL. En este caso, los menores tiempos de degradación se deben no sólo al aumento de la hidrofiliidad del segmento blando, sino también a la disminución de la cristalinidad del mismo. Empleando copolímeros de PCL con δ -valerolactona, ε -decalactona, o por la incorporación de residuos de ácido láctico y glicólico también se puede incrementar la velocidad de hidrólisis del material, debido a que se producen cambios morfológicos que conducen a una disminución en la cristalinidad de los copolímeros.

Los enlaces éster hidrolizan tanto *in vitro* como *in vivo*, generando hidroxiácidos que catalizan la degradación, como el ácido ε -hidroxicaproico en el caso de PCL [21], así como también fragmentos con grupos uretano o uretano urea y grupos carboxílicos terminales.

El empleo de poliésteres en el segmento blando incrementa el efecto de la hidrólisis con respecto al uso de poliéteres y policarbonatos [1]. Los enlaces éster hidrolizan alrededor de un orden de magnitud más rápido que los grupos uretano (**Esquema 9.1**). La degradación de segmentos blandos de poliéster puede observarse a través de cambios en las propiedades mecánicas de los SPU, presentando una disminución de la elongación a la rotura y un aumento en la cristalinidad, si el segmento blando es semicristalino [18,22,23].



Esquema 9.1: Susceptibilidad hidrolítica de diferentes grupos funcionales.

9.1.2.2 Efecto de la estructura de segmentos duros

La naturaleza del segmento duro y su grado de asociación en microdominios (fuerzas de cohesión, tamaño y concentración), tienen una importante influencia en la biodegradación, y por lo tanto, cualquier proceso que perturbe esta estructura (estrés, recocido, etc.) también afectará la bioestabilidad del SPU [24].

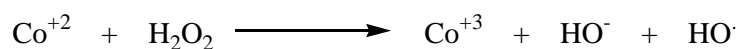
Durante la degradación de poli(éster uretano ureas), los fragmentos conteniendo grupos uretano y urea, productos de la hidrólisis de grupos éster en el SPU original, se degradan a poliaminas. Se han sintetizado numerosos SPU a partir de poliisocianatos alifáticos, degradando *in vitro* e *in vivo* a productos no tóxicos. Como se discutió en la **Sección 1.3.2.1**, los SPU que emplean poliisocianatos aromáticos presentan productos de degradación de toxicidad elevada. Por ejemplo, se reportó que las espumas poliuretánicas preparadas a partir de 2,4-tolueno diisocianato (TDI) degradan *in vitro* a 2,4-tolueno diamina (TDA), que es tóxica, carcinogénica y mutagénica. Sin embargo, se encontró que al aumentar el porcentaje de segmento duro, la liberación de TDA es menor [25]. Esto ocurre ya que la biodegradabilidad del material disminuye debido a la formación de microdominios entre los segmentos duros, enlazados por puente de hidrógeno. Estos resultados se correlacionaron con estudios *in vivo* [26,27], indicando que el grado de asociación por puente de hidrógeno es un parámetro importante a considerar en el estudio de la degradación de un material.

Existen también arquitecturas alternativas a las normalmente empleadas, introduciendo segmentos duros degradables enzimáticamente. Por ejemplo, el empleo de un extendedor de cadena diéster derivado de fenilalanina en formulaciones con LDI y PCL o PEO, mostró sensibilidad a tripsina y quimiotripsina *in vitro*. En este caso, se observó degradación enzimática de grupos éster, uretano y urea, mientras que la degradación hidrolítica en solución amortiguadora resultó menor. La elevada velocidad de degradación enzimática de este material se debe a la presencia de grupos funcionales que pueden actuar como sustratos de enzimas, y a que, generalmente, la introducción de un grupo aromático en la estructura de un poliuretano disminuye la cristalinidad del mismo [28].

9.1.2.3 Estudio de la degradación de poliuretanos

Algunos de los estudios *in vitro* empleados para evaluar la estabilidad de poliuretanos y correlacionarla con su biodegradabilidad *in vivo* incluyen enzimas, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso y ácido nítrico, entre otros, como potenciales agentes degradativos. Si bien el objetivo final es la degradación *in vivo* del material, los ensayos *in vitro* permiten el diseño de protocolos de degradación acelerada.

Un sistema para evaluar la degradación acelerada *in vitro*, que simula la respuesta inflamatoria *in vivo* generada en la interfase de un biomaterial con un tejido biológico, es el medio H₂O₂ / CoCl₂ [29,30,31]. Los cationes Co⁺² (o eventualmente Ag⁺) catalizan la descomposición de H₂O₂ en radicales e iones hidroxilo por medio de la reacción de Haber-Weiss (**Esquema 9.2**). Los radicales hidroxilo inician luego la oxidación de enlaces éter y uretano [30]. En el caso de los enlaces éter, el proceso de oxidación se inicia cuando un radical hidroxilo sustrae un átomo de hidrógeno de un grupo metileno ubicado en posición α con respecto al enlace éter [32].



Esquema 9.2: Reacción de Weiss-Haber.

En ausencia de iones metálicos, el peróxido de hidrógeno no reacciona apreciablemente [33], sin embargo, se han realizado estudios satisfactorios empleando sólo iones metálicos [34,35].

Otros ensayos, llevados a cabo en condiciones no fisiológicas, empleando la enzima papaína [36] y condiciones hidrolíticas extremas como NaOH 3 N a 150 °C [37], se centraron más en la liberación de diaminas de elevada toxicidad como productos de degradación que en estudiar la degradación de sistemas en medios fisiológicos.

En este trabajo se estudia la absorción de agua de las dos series de SPU, su comportamiento hidrolítico en PBS a 37 °C y 70 °C, y su comportamiento oxidativo en H₂O₂ / CoCl₂.

9.2 Materiales y Métodos

9.2.1 Materiales

Se emplearon matrices electrohiladas de PHH y PHD, y filmes de los poliuretanos de las Series H y L, y de PCL diol 42,5 kDa (Aldrich Chemical Co.). NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaN₃, P₂O₅ anhidro, H₂O₂ y CoCl₂ se emplearon sin purificación previa.

9.2.2 Ensayos de comportamiento hidrolítico

Los ensayos de degradación hidrolítica se realizaron empleando muestras de 1 cm x 1 cm x h mm (donde $h = 0,7 \pm 0,1$) cortadas de filmes de los SPU, y de 2 cm x 1 cm x h mm (donde $h = 1,25 \pm 0,15$) para las matrices electrohiladas de SPU. En todos los casos, las masas aproximadas de las muestras fueron de 100 mg. Las muestras se colocaron en viales con 5 ml de solución amortiguadora fosfato pH 7,4 (PBS: NaCl 0,137 M, KCl 0,0027 M, Na₂HPO₄ 0,01 M, KH₂PO₄ 0,0018 M, NaN₃ 0,05 % p/v) en incubadora a 37 °C. El estudio se realizó sin recambio de la solución para evaluar el efecto de la liberación de los productos de degradación sobre el pH del medio. Los ensayos se realizaron por triplicado y a diferentes tiempos predeterminados. Luego de extraer las muestras, éstas se lavaron 3 veces con agua destilada y se secaron en desecador con P₂O₅ anhidro bajo vacío hasta peso constante. En el caso de las matrices electrohiladas, el agua se eliminó mediante liofilización. Finalmente, las muestras se pesaron en una balanza analítica. La pérdida de masa se determinó según la ecuación:

$$\text{Pérdida de masa (\%)} = \frac{m_o - m_t}{m_o} \cdot 100$$

donde m_o es el peso de la muestra a $t = 0$, y m_t es el peso de la muestra después de un determinado tiempo en PBS. Luego de cada ensayo, se determinó el pH final de cada solución de PBS empleando un pHmetro. En todos los casos, los valores obtenidos se calcularon con una desviación estándar teniendo en cuenta un intervalo de confianza de 90 %.

9.2.3 Ensayos de degradación acelerada

9.2.3.1 Degradación hidrolítica a 70 °C

Los ensayos de degradación hidrolítica acelerada se llevaron a cabo empleando muestras de filmes de los SPU. Las muestras se colocaron en viales con 5 ml de una solución PBS pH 7,4 en estufa a 70 °C. Los ensayos se realizaron por triplicado a un tiempo de 40 días. Finalizado el tiempo, se continuó con el mismo procedimiento que en la **Sección 9.2.2**.

9.2.3.2 Degradación en medio oxidativo

Los ensayos se llevaron a cabo empleando muestras de filmes y matrices electrohiladas de los SPU. Las muestras se colocaron en viales con 5 ml de solución 20 % p/v H₂O₂ y 0,1 M CoCl₂ en incubadora a 37 °C. El medio degradativo se renovó cada 72 horas. Los ensayos se realizaron por triplicado a un tiempo de 30 días. Finalizado el tiempo, las muestras fueron tratadas como en la **Sección 9.2.2**.

9.2.4 Cinética de absorción de agua

La absorción de agua se determinó gravimétricamente. Los ensayos se realizaron por triplicado empleando muestras de las dimensiones usadas en la **Sección 9.2.2**. Las muestras se colocaron en viales con 5 ml de PBS en incubadora a 37 °C y se extrajeron a tiempos predeterminados. Las muestras húmedas se secaron ligeramente con papel de filtro para remover sólo el exceso de líquido superficial y luego se pesaron en una balanza analítica. La cantidad de agua absorbida se determinó según la ecuación:

$$\text{Hinchamiento (\%)} = \frac{m_t - m_o}{m_o} \cdot 100$$

donde m_t es el peso de la muestra húmeda después de un determinado tiempo y m_o es el peso de la muestra seca (a $t = 0$). Los valores obtenidos se calcularon con una desviación estándar teniendo en cuenta un intervalo de confianza de 90 %.

9.3 Resultados y Discusión

9.3.1 Cinética de absorción de agua

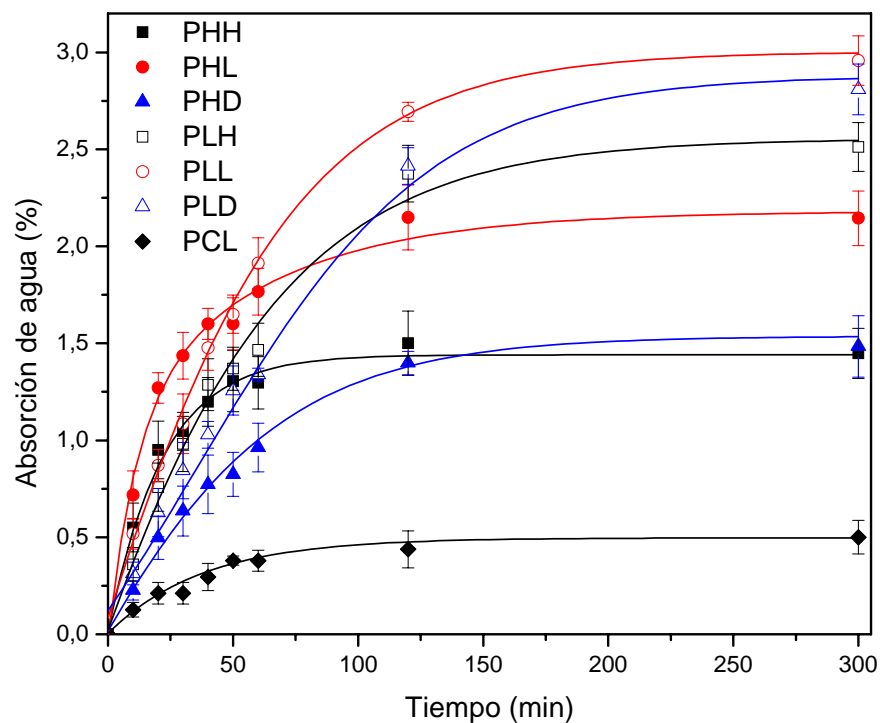


Figura 9.1: Cinética de absorción de agua en PBS a 37 °C de filmes de SPU (Series H y L) y PCL diol 42,5 kDa.

En la **Figura 9.1** se observan los resultados de absorción de agua a 37 °C de filmes de los SPU sintetizados y, a modo comparativo, de PCL diol 42,5 kDa. Todos los materiales presentaron un bajo grado de hinchamiento (inferior a 3 %). La absorción de agua en los filmes tuvo lugar principalmente en las dos primeras horas, luego de lo cual aumentó muy poco. Como era de esperar, PCL diol 42,5 kDa presentó el menor valor

($0,50 \pm 0,09$ %) debido a su hidrofobicidad y a su elevada cristalinidad ($X_c = 59,1$ %). Los filmes de PHH y PHD exhibieron valores similares ($1,45 \pm 0,13$ % y $1,48 \pm 0,16$ %, respectivamente), e inferiores a PHL ($2,14 \pm 0,14$ %), mientras que los SPU de la Serie L mostraron valores superiores (PLH = $2,51 \pm 0,13$ %; PLL = $2,96 \pm 0,13$ % y PLD = $2,81 \pm 0,13$ %). La naturaleza de la región interfásial entre los dominios de segmentos blandos y duros en la Serie L podría ser la responsable de esta diferencia en la absorción de agua.

Por otra parte, las matrices electrohiladas mostraron una rápida absorción de agua que se mantuvo constante luego de los primeros 10 minutos de exposición a PBS. PHH_{mat} mostró un valor de $175,74 \pm 20,07$ %, mientras que PHD_{mat} absorbió un $113,63 \pm 12,36$ % de agua. Estos valores resultaron mucho mayores que los de los filmes, y la rápida absorción indica que el agua se introdujo principalmente en los poros interconectados de las matrices.

9.3.2 Evolución del pH

En la **Figura 9.2** se presenta la variación de pH en los medios de degradación hidrolítica de filmes de los SPU sintetizados y de PCL diol 42,5 kDa. Las series de SPU mostraron comportamientos diferentes. Los medios de la Serie H exhibieron una leve disminución (pH = 7,15 – 7,20) hasta 36 semanas de degradación, produciéndose una caída más marcada al alcanzar las 52 semanas (PHH = $6,97 \pm 0,04$; PHL = $6,92 \pm 0,06$ y PHD = $6,86 \pm 0,03$), aunque Δ pH resultó inferior a 0,60 en todos los casos. Los medios de la Serie L mostraron una disminución continua del pH, hasta superar levemente la unidad de Δ pH luego de 52 semanas (PLH = $6,32 \pm 0,07$; PLL = $6,39 \pm 0,02$ y PLD = $6,37 \pm 0,02$). Esta caída en los valores puede atribuirse a la liberación de especies con grupos ácidos carboxílicos y ácido ϵ -hidroxicaproico, productos de degradación de cadenas de PCL, en mayor medida en los medios de la Serie L.

Por su parte, el valor final de pH observado en el caso de PCL fue de $7,28 \pm 0,03$, lo que indica una baja liberación de especies ácidas al medio de PBS.

En la **Figura 9.3** se observa la variación de pH de los medios de degradación de las matrices electrohiladas y su comparación con los filmes. Los valores de pH se mantuvieron prácticamente constantes en el tiempo estudiado (PHH_{mat} = $7,38 \pm 0,03$ y PHD_{mat} = $7,32 \pm 0,03$) y similares a los obtenidos para los filmes.

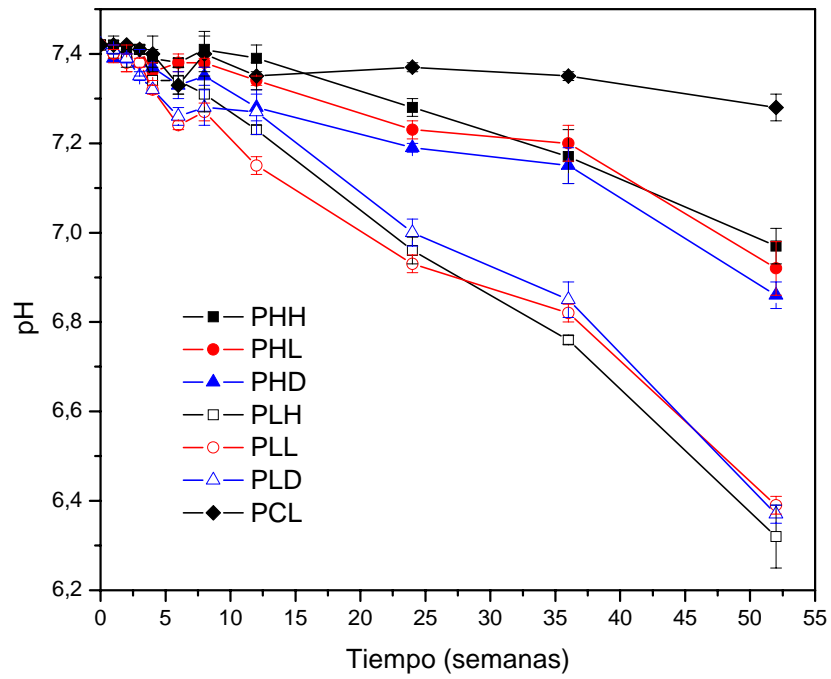


Figura 9.2: Variación de pH en el medio de degradación hidrolítica de filmes de SPU (Series H y L) y PCL diol 42,5 kDa.

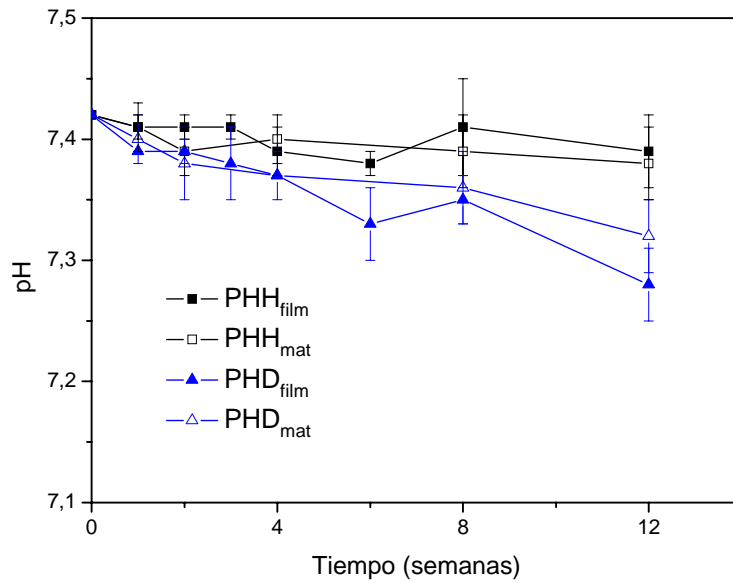


Figura 9.3: Comparación de la variación de pH en el medio de degradación hidrolítica de las matrices electrohiladas y los filmes de PHH y PHD.

9.3.3 Comportamiento hidrolítico

En la **Figura 9.4** se observan los resultados de degradación hidrolítica de los filmes a 37 °C. Los SPU de la Serie H presentaron una pérdida de masa que no superó el 5 % luego de 52 semanas de estudio (PHH = 4,42 ± 0,27 %; PHL = 5,00 ± 0,17 % y PHD = 5,00 ± 0,27 %). Los materiales exhibieron un ligero incremento en la velocidad de degradación luego de las 36 semanas, resultado que concuerda con los valores de pH obtenidos. Este hecho se debe a que la sucesiva ruptura de enlaces en las cadenas poliméricas produce la reducción del peso molecular, formando oligómeros que pueden solubilizarse en el medio. Por otra parte, los SPU de la Serie L mostraron una disminución de su masa muy superior (PLH = 10,68 ± 0,36 %; PLL = 19,63 ± 0,32 % y PLD = 17,82 ± 0,43 %), aumentando considerablemente su velocidad de degradación luego de las 36 semanas. El medio ácido producido luego de 24-36 semanas es el responsable del proceso de autocatálisis observado en este caso.

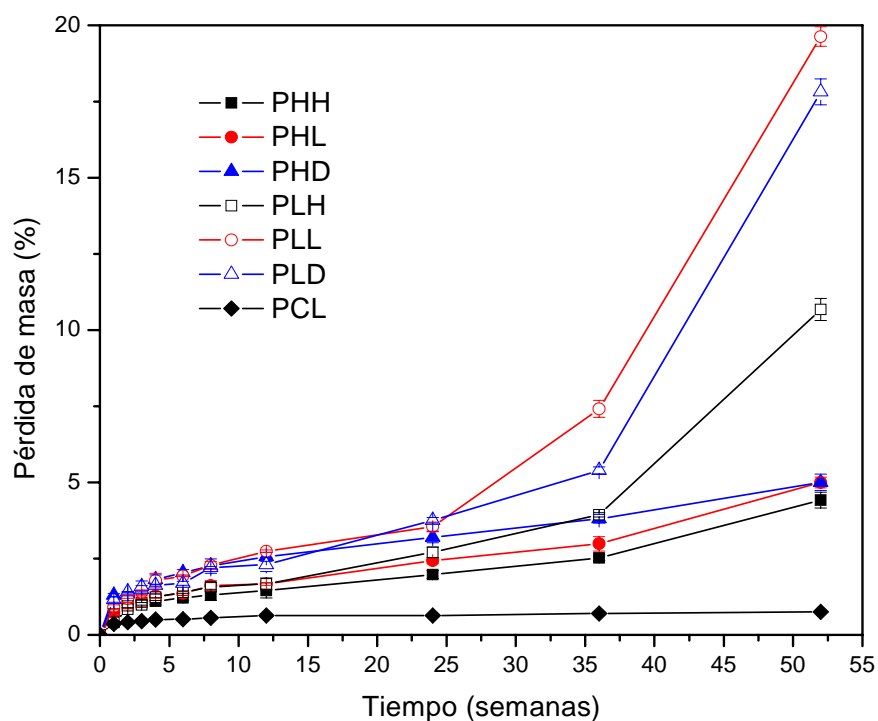


Figura 9.4: Degradación hidrolítica en PBS a 37 °C de filmes de SPU (Series H y L) y PCL diol 42,5 kDa.

La incorporación del extendedor de cadena D-E-D produjo un incremento en la velocidad de degradación de los SPU con respecto a los extendidos con A-H-A. Este aumento puede atribuirse a la presencia de grupos éster hidrolizables en D-E-D.

El comportamiento de los SPU formulados con A-L-A resultó similar a los extendidos con D-E-D. En este caso, a pesar de la presencia de un grupo urea con capacidad de formar puente de hidrógeno, un incremento en la velocidad de degradación puede explicarse por la estructura asimétrica del extendedor, que dificulta la asociación y empaquetamiento en los dominios duros.

Resulta evidente que la mayor absorción de agua, la estructura química de los segmentos duros y la naturaleza de la región interfásica entre los dominios de segmentos blandos y duros de la Serie L, delimitados por el diisocianato asimétrico LDI, tuvo un impacto significativo en su estabilidad hidrolítica resultante.

La pérdida de masa de PCL resultó la más baja ($0,76 \pm 0,04$ %), debido a su elevada hidrofobicidad. Este resultado concuerda con valores de pH aproximadamente constantes durante el período estudiado.

En la **Figura 9.5** se muestra el comportamiento hidrolítico de las matrices electrohiladas de PHH y PHD a las 12 semanas de incubación, y en la **Figura 9.6** su comparación con los filmes.

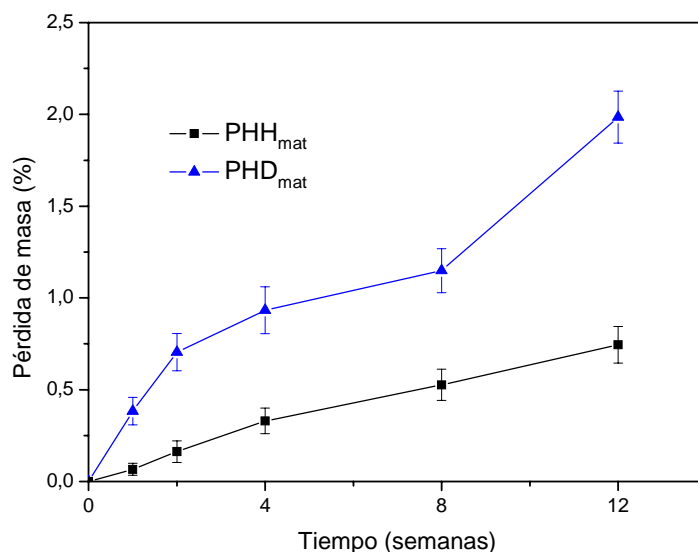


Figura 9.5: Degradación hidrolítica en PBS a 37 °C de matrices electrohiladas de PHH y PHD.

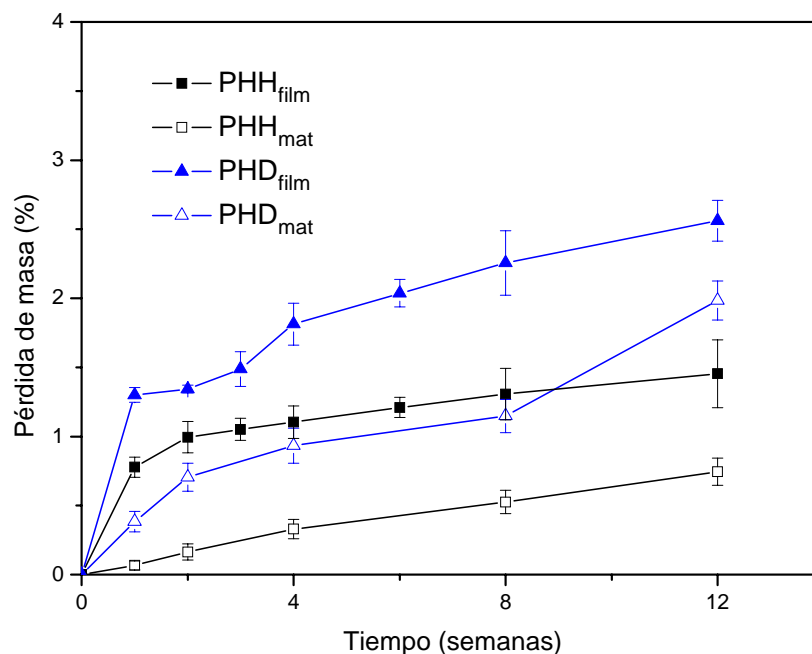


Figura 9.6: Comparación de la degradación hidrolítica en PBS a 37 °C entre matrices electrohiladas y filmes.

Contrariamente a lo esperado, las matrices presentaron una pérdida de masa inferior a los filmes en el tiempo de degradación estudiado. A pesar de presentar una estructura fibrosa, que permite un fácil acceso de agua al interior de la matriz, evidenciado por los elevados valores de absorción de agua, las matrices mostraron valores de pérdida de masa inferiores al 2 % luego de 12 semanas ($\text{PHH}_{\text{mat}} = 0,74 \pm 0,10$ % y $\text{PHD}_{\text{mat}} = 1,98 \pm 0,14$ %). Estos resultados pueden explicarse por la diferente cristalinidad de las estructuras fibrosas y compactas de los SPU, analizada en el **Capítulo 8**. Las estructuras más cristalinas y con un mayor grado de asociación por puente de hidrógeno, dificultan en mayor medida el ingreso de agua en el material, y por lo tanto, inicialmente degradan con velocidad menor.

A pesar de que PHD_{mat} posee mayor cristalinidad de dominios blandos y exhibe una absorción de agua menor que PHH_{mat} , su pérdida de masa resultó mayor. La diferencia entre estos materiales se encuentra en la estructura química del extendedor de cadena. Si bien ambos compuestos presentan una simetría estructural, la presencia de sitios de degradación en el interior del segmento duro de PHD_{mat} contribuye al comportamiento observado.

9.3.4 Degradación acelerada

En la **Tabla 9.1** se muestran los resultados de degradación hidrolítica y oxidativa de los filmes en condiciones aceleradas.

Las series de SPU exhibieron un comportamiento diferente frente a la degradación hidrolítica acelerada. Los SPU de la Serie H presentaron una pérdida de masa cercana al 20 %, mientras que los de la Serie L dieron lugar a disolución parcial de los filmes, cuyos residuos carecieron de consistencia mecánica. Una menor estabilidad hidrolítica de los SPU de la Serie L concuerda con los resultados obtenidos en el ensayo realizado a 37 °C. A partir de los valores de pH puede concluirse que los procesos degradativos fueron autocatalizados por las especies ácidas liberadas.

Los materiales respondieron de manera diferente al medio oxidativo. Dentro de cada serie, la pérdida de masa mostró una dependencia con el extendedor de cadena empleado, aumentando en orden A-H-A, A-L-A, D-E-D. La acidez del medio oxidativo contribuyó a la mayor degradación de los SPU extendidos con D-E-D, debido a la hidrólisis de los enlaces éster presentes en los dominios duros. Los materiales formulados con el mismo extendedor de cadena exhibieron una degradación mayor en el caso de la Serie L. Nuevamente, el efecto del LDI como conector entre segmentos blandos y duros genera una región interfásica desordenada que favorece el ingreso del medio degradativo.

Tabla 9.1: Degradación acelerada de los SPU sintetizados (Series H y L) y de PCL diol 42,5 kDa.

Serie	SPU	PBS 70 °C (40 días) (%)	pH PBS 70 °C	H ₂ O ₂ / CoCl ₂ 37 °C (30 días) (%)
	PHH	16,84 ± 1,08	6,05 ± 0,25	1,10 ± 0,17
H	PHL	20,81 ± 1,74	5,99 ± 0,12	2,58 ± 0,30
	PHD	17,55 ± 0,67	5,94 ± 0,10	4,03 ± 0,22
	PLH	-	4,87 ± 0,17	3,66 ± 0,15
L	PLL	-	4,96 ± 0,07	4,66 ± 0,09
	PLD	-	4,82 ± 0,08	-
	PCL	3,20 ± 0,06	6,99 ± 0,03	0,78 ± 0,14

Las matrices electrohiladas sólo se estudiaron en el medio oxidativo, mostrando valores de pérdida de masa muy superiores a los encontrados para los filmes ($PHH_{mat} = 14,66 \pm 1,67 \%$ y $PHD_{mat} = 12,46 \pm 1,22 \%$).

La morfología fibrosa de las matrices influyó en la velocidad de degradación observada en el medio acelerado. Los resultados sugieren que esta velocidad no es constante sino que depende del tiempo de degradación y del tipo de muestra. Las matrices iniciarían la degradación más lentamente que los filmes, pero posteriormente su velocidad aumentaría más que la de éstos.

La pérdida de masa de PHH_{mat} en este medio resultó mayor que la de PHD_{mat} , contrario a lo observado en PBS a 37 °C. Si bien la pérdida de masa en PHH_{mat} es menor a tiempos de degradación bajos, esta matriz presenta un diámetro promedio de fibra un 50 % menor que el de PHD_{mat} , situación que acelera el proceso degradativo.

9.4 Conclusiones parciales

El bajo grado de hinchamiento (inferior a 3 %) encontrado en todos los SPU concuerda con un alto contenido de PCL. Estos valores resultaron superiores a PCL debido a la menor cristalinidad de los dominios blandos, y a los grupos polares introducidos en los segmentos duros. La mayor absorción de agua en la Serie L se atribuyó a la naturaleza de la región interfásica entre los dominios de segmentos blandos y duros.

La estructura química de los diisocianatos y extendedores de cadena tuvo un impacto significativo en la estabilidad hidrolítica y oxidativa de los SPU. Los SPU de la Serie L presentaron mayor degradabilidad frente a los correspondientes de la Serie H. Los valores de pH de la Serie L revelaron la presencia de degradación autocatalizada, que favoreció el proceso de pérdida de masa.

La introducción de un extensor de cadena con enlaces éster, que añade sitios hidrolizables en los segmentos duros, contribuyó a la mayor degradación de los SPU.

La morfología fibrosa de las matrices electrohiladas influyó en la absorción de agua y en la velocidad de degradación observada en los diferentes medios. Las estructuras más cristalinas y con un mayor grado de asociación por puente de hidrógeno, dificultan en mayor medida el ingreso de agua en el material, y por lo tanto, inicialmente degradan con menor velocidad.

El aumento en la pérdida de masa de las matrices con respecto a los filmes en medio oxidativo acelerado indica que la velocidad de degradación no es constante sino que depende del tiempo de degradación y del tipo de muestra.

El diámetro promedio de fibra influyó en la velocidad de degradación de las matrices electrohiladas.

9.5 Referencias

- [1] Stokes K., McVennes R. Polyurethane elastomer biostability. *J Biomater Appl*, 9 (4): 321–335, **1995**.
- [2] Phillips R.E., Smith M.C., Thoma M.J. Biomedical applications of polyurethanes: implications of failure mechanisms. *J Biomater Appl*, 3 (2): 207–227, **1988**.
- [3] Santerre J.P., Duguay D.G., Labow R.S., Brash J.L. Interactions of hydrolytic enzymes at an aqueous-polyurethane interface. Proteins at interfaces II. *J Am Chem Soc*, 352–370, **1995**.
- [4] Anderson J.M. Chapter 4. Mechanisms of inflammation and infection with implanted devices. *Cardiovasc Pathol*, 2 (3) Suppl 1: 33–41, **1993**.
- [5] Xie X., Wang R., Li J., Luo L., Zhong Y., Zhao C. Fluorocarbon Chain End-Capped Poly(carbonate urethane)s as Biomaterials: Blood Compatibility and Chemical Stability Assessments. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, 89 B (1): 223–241, **2009**.
- [6] Santerre J.P., Woodhouse K., Laroche G., Labow R.S., Understanding the biodegradation of polyurethanes: From classical implants to tissue engineering materials. *Biomaterials*, 26 (35): 7457–7470, **2005**.
- [7] Tang Y.W., Revenko I., Labow R.S., Santerre J.P. Influence of surface morphology and chemistry on the enzyme catalyzed biodegradation of polycarbonate-urethanes. *J Biomater Sci Polym Ed*, 13 (4): 463–483, **2002**.
- [8] Lin D.T., Young T.H., Fang Y. Studies on the effect of surface properties on the biocompatibility of polyurethane membranes. *Biomaterials*, 22 (12): 1521–1529, **2001**.
- [9] Ward R.S., White K.A., Hu C.B. Use of surface modifying additives in the development of a new biomedical polyurethaneurea. In: Planck H., Egbers G., Syré I.,

editors. Polyurethanes in biomedical engineering. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 213, **1987**.

[10] Tang Y.W., Santerre J.P., Labow R.S., Taylor D.G. Use of surface-modifying macromolecules to enhance the biostability of segmented polyurethanes. *J Biomed Mater Res Part A*, 35A (3): 371–381, **1997**.

[11] Jahangir R., McCloskey C.B., McClung W.G., Labow R.S., Brash J.L., Santerre J.P. The influence of protein adsorption and surface modifying macromolecules on the hydrolytic degradation of a poly(ether-urethane) by cholesterol esterase. *Biomaterials*, 24 (1): 121–130, **2003**.

[12] Ernsting M.J., Labow R.S., Santerre J.P. Surface modification of a polycarbonate-urethane using a vitamin-E derivatized fluoroalkyl surface modifier. *J Biomater Sci Polym Ed*, 14 (12): 1411–1426, **2003**.

[13] Woo G.L.Y., Yang M.L., Yin H.Q., Jaffer F., Mittelman M.W., Santerre J.P. Biological characterization of a novel biodegradable antimicrobial polymer synthesized with fluoroquinolones. *J Biomed Mater Res Part A*, 59A (1): 35–45, **2002**.

[14] Skarja G.A., Woodhouse K.A. Synthesis and characterization of degradable polyurethane elastomers containing an amino acid-based chain extender. *J Biomater Sci Polym Ed*, 9 (3): 271–295, **1998**.

[15] Cohn D., Stern T., Gonzales M.F., Epstein J. Biodegradable poly(ethylene oxide)/poly(ϵ -caprolactone) multiblock copolymers. *J Biomed Mater Res Part A*, 59A (2): 273–281, **2002**.

[16] Guan J.J., Sacks M.S., Beckman E.J., Wagner W.R. Synthesis, characterization, and cytocompatibility of elastomeric, biodegradable poly(ester-urethane) ureas based on poly(caprolactone) and putrescine. *J Biomed Mater Res Part A*, 61A (3): 493–503, **2002**.

[17] Gorna K., Gogolewski S. Biodegradable polyurethanes for implants. II. In vitro degradation and calcification of materials from poly (ϵ -caprolactone)-poly(ethylene oxide) diols and various chain extenders. *J Biomed Mater Res Part A*, 60A (4): 592–606, **2002**.

- [18] Storey R.F., Hickey T.P. Degradable polyurethane networks based on D,L-lactide, glycolide, ϵ -caprolactone, and trimethylene carbonate homopolyester and copolyester triols. *Polymer*, 35 (4): 830–838, **1994**.
- [19] Hiltunen K., Seppälä J.V., Härkönen M. Effect of catalyst and polymerization conditions on the preparation of low molecular weight lactic acid polymers. *Macromolecules*, 30 (3): 373–379, **1997**.
- [20] Pitt C.G., Chasalow Y.M., Hibionada Y.M., Klimas D.M., Schindler A. Aliphatic polyesters I. The degradation of poly(ϵ -caprolactone) *in-vivo*. *J Appl Polym Sci*, 26 (11): 3779–3787, **1981**.
- [21] Taylor M.S., Daniels A.U., Andriano K.P., Heller J. Six Bioabsorbable Polymers: *In Vitro* Acute Toxicity of Accumulated Degradation Products. *J Appl Biomat*, 5 (2): 151–157, **1994**.
- [22] Tsuji H., Mizuno A., Ikada Y. Properties and morphology of poly(L-lactide). III. Effects of initial crystallinity on long-term *in vitro* hydrolysis of high molecular weight poly(L-lactide) film in phosphate-buffered solution. *J Appl Polym Sci*, 77 (7): 1452–1464, **2000**.
- [23] Asplund B., Sperens J., Mathisen T., Hilborn J. Effects of hydrolysis on a new biodegradable co-polymer. *J Biomater Sci Polym Edn*, 17 (6): 615–630, **2006**.
- [24] Hergenrother R.W., Wabers H.D., Cooper S.L. Effect of hard segment chemistry and strain on the stability of polyurethanes: *in vivo* biostability. *Biomaterials*, 14 (6): 449–458, **1993**.
- [25] Santerre JP, Labow RS. The effect of hard segment size on the hydrolytic stability of polyether-urea-urethanes when exposed to cholesterol esterase. *J Biomed Mater Res Part A*, 36A (2): 223–232, **1997**.
- [26] Pinchuk L., Martin J.B., Esquivel M.C., MacGregor D.C. The use of silicone/polyurethane graft polymers as a means of eliminating surface stress cracking of polyurethane prosthesis. *J Biomater Appl*, 3 (2): 260–296, **1988**.
- [27] Stokes K., Urbanski P., Cobian K. New test methods for the evaluation of stress cracking and metal catalyzed oxidation in implanted polymers. In: Planck H., Egbers

G., Syré I., editors. Polyurethanes in biomedical engineering II. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 109–127, **1987**.

[28] Skarja G.A., Woodhouse K.A. *In vitro* degradation and erosion of degradable, segmented polyurethanes containing an amino acid-based chain extender. *J Biomater Sci Polym Ed*, 12 (8): 851–873, **2001**.

[29] Zhao Q., Casas-Bejar J., Urbanski P., Stokes K. Glass wool-H₂O₂/CoCl₂ test system for *in vitro* evaluation of biodegradative stress cracking in polyurethane elastomers. *J Biomed Mater Res Part A*, 29A (4): 467–475, **1995**.

[30] Schubert M.A., Wiggins M.J., Schaefer M.P., Hiltner A., Anderson J.M. Oxidative biodegradation mechanisms of biaxially strained poly(etherurethane urea) elastomers, *J Biomed Mater Res Part A*, 29A (3): 337–347, **1995**.

[31] Zhao Q., McNally A.K., Rubin K.R., Reiner M., Wu Y., Rosa-Caprara V., Anderson J.M., Hiltner A., Urbanski P., Stokes K. Human plasma α_2 -macroglobulin promotes *in vitro* oxidative stress cracking of Pellethane 2363-80A: *In vivo* and *in vitro* correlations. *J Biomed Mater Res Part A*, 27A (3): 379–388, **1993**.

[32] Wu Y., Sellitti C., Anderson J.M., Hiltner A., Lodoen G.A., Payet C.R. An FTIR-ATR investigation of *in vivo* poly(ether urethane) degradation, *J Appl Polym Sci*, 46 (2): 201–211, **1992**.

[33] Stokes K., Urbanski P., Upton J. The *in vivo* auto-oxidation of polyether polyurethane by metal ions. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1 (3): 207–230, **1989**.

[34] Thoma R.J., Phillips R.E. Studies of poly(ether)urethane pacemaker lead insulation oxidation. *J Biomed Mater Res Part A*, 21A (4): 525–530, **1987**.

[35] Takahara A., Coury A.J., Hergenrother R.W., Cooper S.L. Effect of soft segment chemistry on the biostability of segmented polyurethanes I. *In vitro* oxidation. *J Biomed Mater Res Part A*, 25A (3): 341–356, **1991**.

[36] Szycher M., Siciliano A.A. An assessment of 2,4-TDA formation from Surgitek polyurethane foam under simulated physiological conditions. *J Biomater Appl*, 5 (4): 323–336, **1991**.

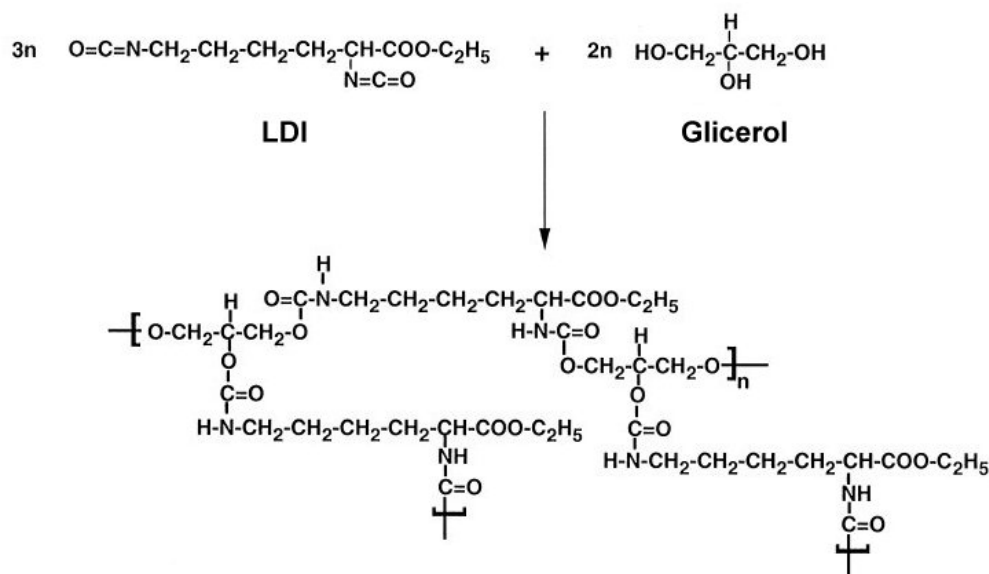
[37] Bathich C., Williams J., Roy K. Toxic hydrolysis product from biodegradable foam implant. *J Biomed Mater Res Part A*, 23A (S14): 311–319, **1989**.

CAPÍTULO 10

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE REDES POLIURETÁNICAS BIORREABSORBIBLES CON HIDROFILICIDAD CONTROLADA

10.1 Introducción

La incorporación de al menos un reactivo (poliisocianato, poli­ol) con funcionalidad mayor a dos da lugar a la síntesis de redes poliuretánicas (PUN) (**Esquema 10.1**). Estas redes pueden ser rígidas o elastoméricas, ya sea en la forma de membranas no porosas o de espumas de celdas abiertas interconectadas o cerradas. El interés por los poliuretanos entrecruzados para aplicaciones biomédicas, en comparación con los SPU, es aún muy limitado. En la literatura se encuentran escasos ejemplos de redes poliuretánicas biocompatibles y biorreabsorbibles. En los primeros trabajos, Bruin y colaboradores estudiaron sistemas obtenidos a partir de LDI y copoliésteres estrella con 6 brazos, P(L-LA-co-CL) o P(GA-co-CL), iniciados por mioinositol [1,2]. Los elastómeros sintetizados demostraron ser de interés para la construcción de piel artificial con dos capas: una capa inferior macroporosa permite la regeneración de la dermis, mientras que otra capa superior actúa como barrera contra la infección y permite la permeabilidad del agua. Posteriormente, Storey y colaboradores [3] investigaron los sistemas sintetizados a partir de LDI y una serie de copoliésteres triol, mientras que Beckman y colaboradores [4] obtuvieron espumas rígidas a partir de LDI, glicerol y agua, e incluso emplearon ácido ascórbico para mejorar la actividad biológica de los precursores de osteoblastos [5].



Esquema 10.1: Ejemplo de síntesis de una red poliuretánica a partir de LDI y glicerol [4].

Mediante la reacción de poliéster polioles cortos iniciados por pentaeritritol, con prepolímeros terminados en isocianato que son líquidos a temperatura ambiente, se desarrolló una familia de PUN biocompatibles y biorreabsorbibles [6]. Estos materiales mostraron un amplio intervalo de propiedades mecánicas, obteniendo desde redes elastoméricas hasta rígidas. Estas formulaciones pueden inyectarse *in situ* y son autocurables, lo cual presenta una enorme ventaja para su empleo en cirugías mínimamente invasivas como la artroscopía, adhesión a tejidos, capacidad para incorporar componentes que favorezcan el crecimiento celular, rellenar defectos con geometrías complejas, e incluso en ingeniería de tejidos. Recientemente, Guelcher y colaboradores [7] investigaron este tipo de materiales como sustitutos de cementos acrílicos para ortopedia empleando la técnica del cuasi-prepolímero. En esta estrategia la mezcla reactiva se compone de un poliisocianato, obtenido a partir de un copoliéster triol y exceso de di- o triisocianato, y otro componente, constituido por el copoliéster triol. El empleo de copolímeros tribloque del tipo poli(óxido de etileno)-*b*-poli(óxido de propileno)-*b*-poli(óxido de etileno) diol (PEO-PPO-PEO) en redes poliuretánicas, permitió la obtención de PUN hidrofílicas biocompatibles con comportamiento reversible de hinchamiento termosensible negativo [8].

Aunque el estudio de poliuretanos segmentados y multibloques con hidrofili­cidad controlada por la composición se encuentra en la literatura [9-11], son muy escasos los trabajos relacionados con redes poliuretánicas hidrofílicas. En las redes constituidas por segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos biorreabsorbibles, el componente hidrofílico asegura el hinchamiento del sistema en un medio acuoso, mientras que la parte hidrofóbica regula el hinchamiento y resistencia mecánica. Ambos componentes permiten la dispersión homogénea de principios bioactivos hidrofílicos, tales como proteínas, péptidos y oligonucleótidos, e hidrofóbicos.

Las características de estabilidad y degradación de los materiales poliuretánicos resultan ideales para el diseño de matrices para ingeniería de tejidos con capacidad para liberar principios bioactivos. Sin embargo, el uso de poliuretanos en el campo de liberación controlada permanece bastante inexplorado [12]. Por otra parte, el desarrollo de elastómeros blandos con propiedades mecánicas que se ajusten a las del tejido de miocardio resulta de notable interés para la ingeniería de tejidos cardíacos. La implantación en regiones infartadas de parches formados por materiales sintéticos

biocompatibles, elásticos, degradables y poblados *in vitro* con cardiomiocitos, constituye una estrategia actualmente en etapa de exploración [13].

En este capítulo se describe la obtención y la caracterización preliminar de redes poliuretánicas biorreabsorbibles con un intervalo de hidrofobicidad e hidrofiliidad. Las redes preparadas son de tipo $A_2(B_3C_2)$, donde A es un diisocianato alifático, B y C son los polioles, y los subíndices indican la funcionalidad de cada uno.

10.2 Materiales y Métodos

10.2.1 Materiales

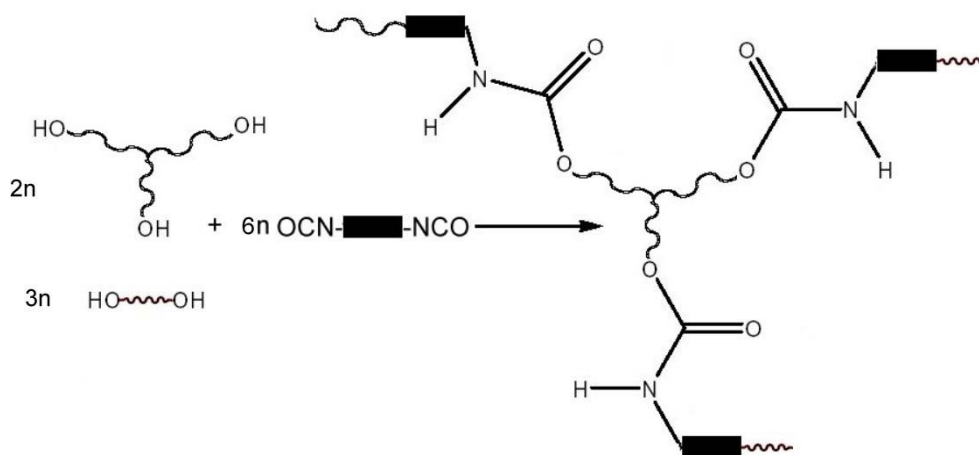
Se empleó como componente hidrofóbico poli(ϵ -caprolactonas) estrella de tres brazos (PCL triol, $M_n = 1060$ y 3130 Da), sintetizadas como se detalla en la **Sección 3.2.2.2**, y PCL triol comercial ($M_n = 900$ Da, Aldrich Chemical Co.). Como componente hidrofílico se utilizó poli(etilenglicol) (PEG, $M_n = 400$ Da, Aldrich), oligómero soluble en agua, de buena biocompatibilidad y baja toxicidad. El secado de los polioles se llevó a cabo en estufa a 60 °C bajo vacío (4 torr) durante 2 horas. Se empleó 1,6-hexametilendiisocianato (HDI), *N,N'*-dimetilacetamida (DMAc, Aldrich Chemical Co.) y dibutildilaurato de estaño (DBTDL, Fluka). La DMAc se separó en fracciones de 30 ml, se purificó mediante secado con tamices moleculares (4 Å) y se destiló a 60 °C a presión reducida (10 torr). El resto de los reactivos se empleó sin purificación previa.

10.2.2 Síntesis de redes poliuretánicas (PUN)

La síntesis se realizó empleando una metodología desarrollada para obtener filmes homogéneos, libres de burbujas, sin contenido de isocianato residual (determinado por espectroscopía FTIR-ATR) y con buena desmoldabilidad. El procedimiento adoptado consistió en el agregado de una cantidad predeterminada de PCL triol en un tubo de vidrio de 2,5 cm de diámetro, que se disolvió en una cantidad mínima de DMAc (por ejemplo 2 g de PCL triol en 2,5 ml de DMAc). A continuación se pesó la cantidad necesaria de PEG₄₀₀ en el mismo recipiente y se agregó el catalizador. Los polioles y el catalizador se mezclaron exhaustivamente durante 30 segundos con vortex, agregándose luego la cantidad necesaria de HDI. La mezcla

reactiva se agitó con vortex durante 1 minuto y se llevó a 4 torr durante aproximadamente 5 minutos, hasta la completa eliminación de burbujas de aire introducidas durante las etapas de mezclado. La mezcla reactiva ya desgasificada se volcó sobre una superficie de teflón, llevándose a cabo el curado y la eliminación del solvente en estufa de secado a 60 °C durante 24 horas (**Esquema 10.2**). Posteriormente, el material obtenido se secó exhaustivamente bajo vacío (4 torr) a temperatura ambiente para eliminar las trazas de solvente residual.

Los reactivos mantuvieron la relación molar $([\text{OH}]_{\text{PCLtriol}} + [\text{OH}]_{\text{PEG400}}) \times 1,05 = [\text{NCO}]_{\text{HDI}}$. La serie completa comprende las redes con el 10, 30, 50, 70, 90 y 100 % en peso de PCL triol en el componente hidroxilado. La muestras de cada serie se nombraron como PX-Y, donde X e Y corresponden respectivamente a los porcentajes de PCL triol y de PEG₄₀₀ en la formulación. Por ejemplo, P70-30 indica una red sintetizada empleando los polioles PCL triol en un 70 % y PEG₄₀₀ en un 30 %.



Esquema 10.2: Síntesis de PUN con polioles hidrofílicos difuncionales e hidrofóbicos trifuncionales (entrecruzante químico), para el caso particular de la formulación P40-60, expresada en moles.

10.2.3 Métodos de caracterización fisicoquímica

10.2.3.1 Determinación del contenido de solubles

Las muestras se cortaron en círculos con punzón (espesor: $1,25 \pm 0,25$ mm, diámetro: 10 mm) y luego se pesaron, se sumergieron en agua destilada durante 24 horas a 37 °C para extraer los solubles, se almacenaron a -20 °C en freezer y

posteriormente se liofilizaron durante 24 horas empleando un liofilizador Virtis SP Industries, Benchtop 2.0K, USA. Finalmente, las muestras se pesaron nuevamente para determinar el contenido de solubles:

$$\text{Contenido de sol (\%)} = \frac{m_0 - m_f}{m_0} \cdot 100$$

donde m_0 es el peso inicial de la muestra, y m_f es el peso de la muestra después de la extracción de solubles.

10.2.3.2 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)

Se empleó un espectrómetro FTIR Nicolet 6700 con un accesorio de reflectancia total interna atenuada (ATR). Los espectros de las muestras, obtenidos a temperatura ambiente realizando 64 barridos con una resolución de 2 cm^{-1} , permitieron la identificación de grupos funcionales.

10.2.3.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las propiedades térmicas de los productos sintetizados se determinaron empleando un calorímetro Shimadzu DSC-50, con purga de nitrógeno y una velocidad de barrido de $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, en el intervalo de temperaturas de $-120 \text{ }^\circ\text{C}$ a $250 \text{ }^\circ\text{C}$. La T_g se midió en el inicio de la transición (*onset*).

10.2.3.4 Cinética de absorción de agua

La absorción de agua se determinó gravimétricamente. Luego de extraer los solubles, las muestras se colocaron en viales con 5 ml de PBS en incubadora a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y se extrajeron a tiempos predeterminados. Los discos húmedos se secaron ligeramente con papel de filtro para remover sólo el exceso de líquido superficial y luego se pesaron en una balanza analítica. La cantidad de agua absorbida se expresó como porcentaje de hinchamiento, determinado del mismo modo que en la **Sección 9.2.4**. Los ensayos se realizaron por triplicado.

10.3 Resultados y Discusión

10.3.1 Síntesis de PUN

Se exploraron las condiciones experimentales más apropiadas (tiempo, temperatura, concentración de monómeros en solución de DMAc) para la obtención de filmes homogéneos y reproducibles. Se empleó la cantidad mínima de DMAc para el mezclado óptimo de los reactivos en la formulación y al mismo tiempo para obtener una viscosidad de la mezcla reactiva apropiada para la etapa de colada.

Se sintetizaron tres series de redes poliuretánicas con distinto contenido de componentes hidrofóbicos (PCL₉₀₀, PCL₁₀₆₀ y PCL₃₁₃₀) e hidrofílico (PEG₄₀₀), las que se denominaron PUN₉₀₀, PUN₁₀₆₀ y PUN₃₁₃₀, respectivamente. El poliol comercial PCL₉₀₀ se utilizó para comparar las propiedades de los PUN obtenidos con los sintetizados a partir de un poliol de peso molecular prácticamente similar pero completamente caracterizado. Como se describió en la **Sección 3.3.2**, los poliésteres estrella PCL₁₀₆₀ y PCL₃₁₃₀ tienen una funcionalidad de 3 (hidroxilos terminales = 3), aunque presentan diferentes longitudes promedio de cadenas de PCL y distribución de especies (glicerol mono, di y trisustituido) (**Tabla 10.1**). Esta diversidad de especies torna altamente compleja la determinación del peso molecular promedio entre puntos de entrecruzamiento, así como la relación propiedades–estructura de las redes poliuretánicas.

Tabla 10.1: Características estructurales de las PCL triol PCL₁₀₆₀ y PCL₃₁₃₀ empleadas en la síntesis de PUN (ver **Tabla 3.3**).

Relación [ε-CL : OH]	Mn_{tit} (Da)	Mn_t (Da)	f_e	Número de brazos (%)			Ln
				1	2	3	
2 : 1	1060	777	2,1	20,1	46,4	33,5	4,5
8 : 1	3130	2832	2,7	1,1	30,6	68,3	13,1

Mn_t = Mn teórico, Mn_{tit} = Mn obtenido por titulación,

f_e = funcionalidad efectiva, Ln = longitud promedio de cadenas de PCL.

La **Tabla 10.2** muestra los valores del contenido de solubles para todas las PUN sintetizadas. La fracción sol aumentó con el incremento del contenido de componente

hidrofilico (PEG₄₀₀). Un contenido de PEG₄₀₀ mayor al 70 % en peso en el componente hidroxilado condujo a la disgregación de las muestras durante el proceso de extracción, debida a la solubilización de partes de las mismas. Por lo tanto, no fue posible determinar el contenido de solubles de las muestras P10-90.

Tabla 10.2: Contenido de sol (%) para las PUN sintetizadas.

Relación PCL-PEG ₄₀₀	Serie PUN ₁₀₆₀ Contenido de sol (%)	Serie PUN ₃₁₃₀ Contenido de sol (%)	Serie PUN ₉₀₀ Contenido de sol (%)
P100-0	4,7	1,1	2,1
P90-10	4,6	1,6	4,6
P70-30	-	10,7	5,3
P50-50	-	17,0	10,2
P30-70	20,0	16,0	21,7
P10-90	n.d.	n.d.	n.d.

10.3.2 Espectroscopía de infrarrojo (FTIR)

En la **Figura 10.1** se muestran dos regiones principales (metilenos y carbonilos) del espectro infrarrojo de las redes poliuretánicas de las Series PUN₁₀₆₀ y PUN₃₁₃₀. La región N-H, ubicada entre 3100 y 3600 cm⁻¹, mostró mucho ruido debido posiblemente a la absorción de agua de las muestras.

En la región de grupos metileno se observaron dos señales a 2935 cm⁻¹ y 2862 cm⁻¹ (ν_a C-H y ν_s C-H en CH₂, respectivamente) para PUN₁₀₆₀ P100-0. Estas señales modificaron su intensidad con la disminución del contenido de PCL y el aumento de PEG₄₀₀ en la serie, disminuyendo el pico de 2935 cm⁻¹ y aumentando el de 2862 cm⁻¹, debido a que los monómeros guardan la misma relación de intensidades. La misma observación se realizó en las redes de la Serie PUN₃₁₃₀, a partir de las señales a 2939 cm⁻¹ y 2863 cm⁻¹ de P100-0.

La región de grupos carbonilo se localiza entre 1600 y 1800 cm⁻¹. La red PUN₁₀₆₀ P100-0 exhibió una señal centrada en 1724 cm⁻¹ (ν C=O en éster) que disminuyó su intensidad con la disminución del contenido de PCL en la serie, y un hombro en 1697 cm⁻¹ (banda carbonilo-uretano amida I) que evidenció la formación de

grupos uretano. Este hombro se mostró más pronunciado con el aumento del contenido de PEG₄₀₀, debido a la formación de mayor cantidad de enlaces uretano, y en las redes con 50% de PEG se separó en dos picos manteniendo los mismos números de onda. Independientemente de la longitud de cadena de PCL, los mismos efectos se observaron en la Serie PUN₃₁₃₀ ($\nu\text{C=O}$ en éster: 1720 cm^{-1} y banda carbonilo-uretano amida I: hombro en 1697 cm^{-1}).

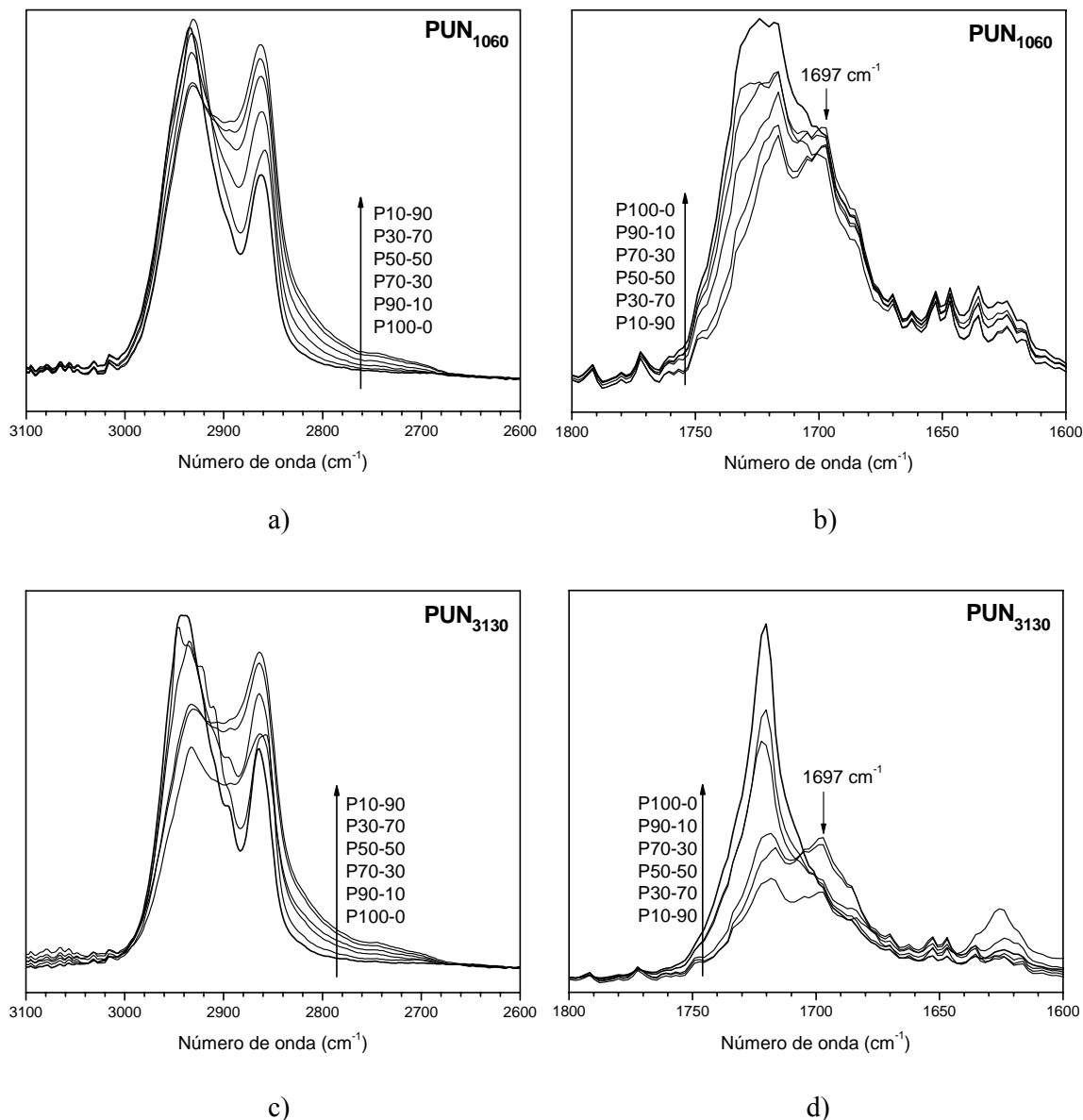
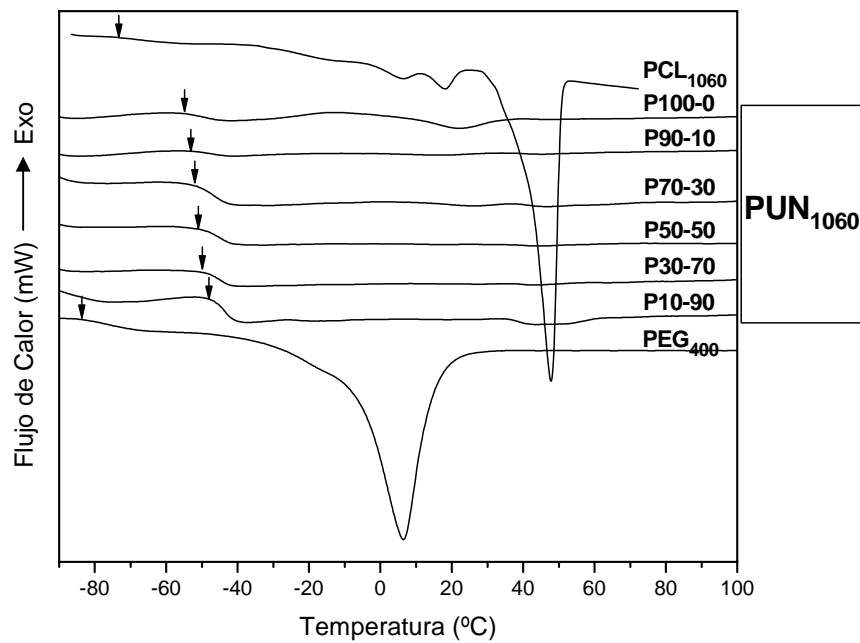


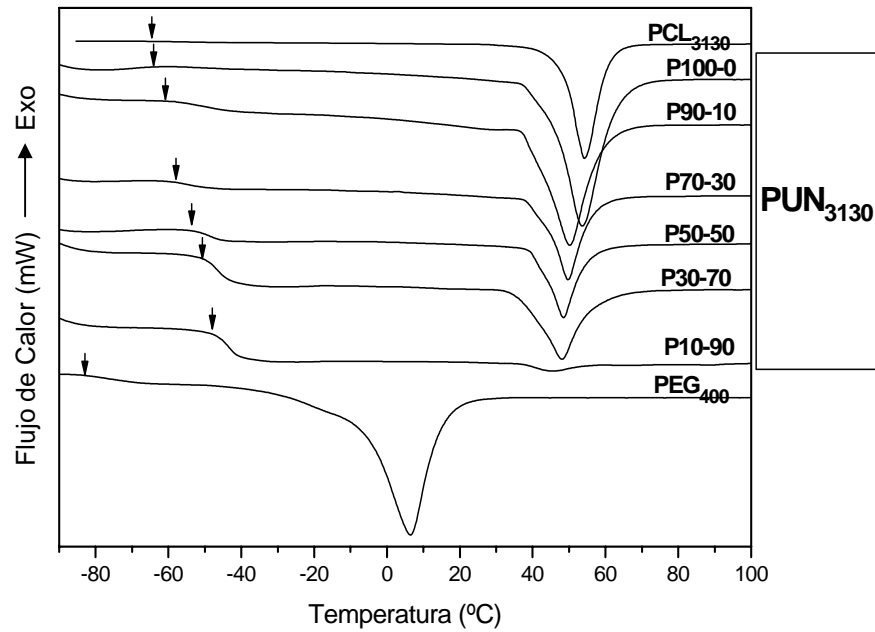
Figura 10.1: Espectros ATR-FTIR de las redes poliuretánicas PCL-PEG₄₀₀. Serie PUN₁₀₆₀: a) región de metilenos y b) región de carbonilos; Serie PUN₃₁₃₀: c) región de metilenos y d) región de carbonilos.

10.3.3 Propiedades térmicas

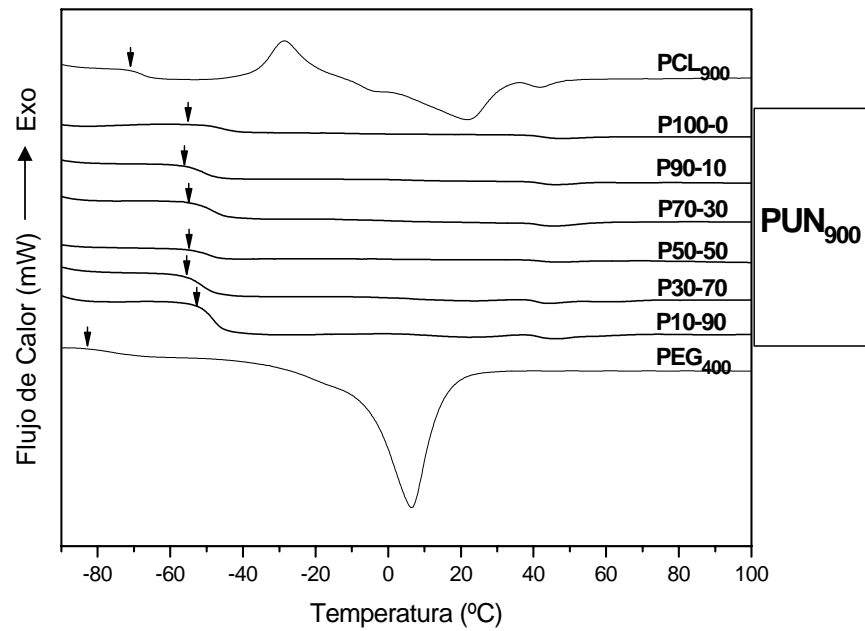
La **Figura 10.2** muestra los termogramas obtenidos por DSC para las redes poliuretánicas, los polioles PCL triol y PEG₄₀₀. De acuerdo a los componentes empleados en la formulación (diol de cadena corta, triol y diisocianato), la ausencia de un macrodiol condujo a una estructura de red polimérica sin microfases de dominios blandos y duros. Por lo tanto, se espera la aparición de una única temperatura de transición vítrea y eventualmente la presencia de una fase cristalina, dependiendo de la longitud de cadena de los polioles.



a)



b)



c)

Figura 10.2: Termogramas DSC de las redes poliuretánicas PCL-PEG₄₀₀: a) Serie PUN₁₀₆₀, b) Serie PUN₃₁₃₀, c) Serie PUN₉₀₀. Se muestran también los termogramas de los polioles PCL triol de distinto peso molecular y PEG₄₀₀.

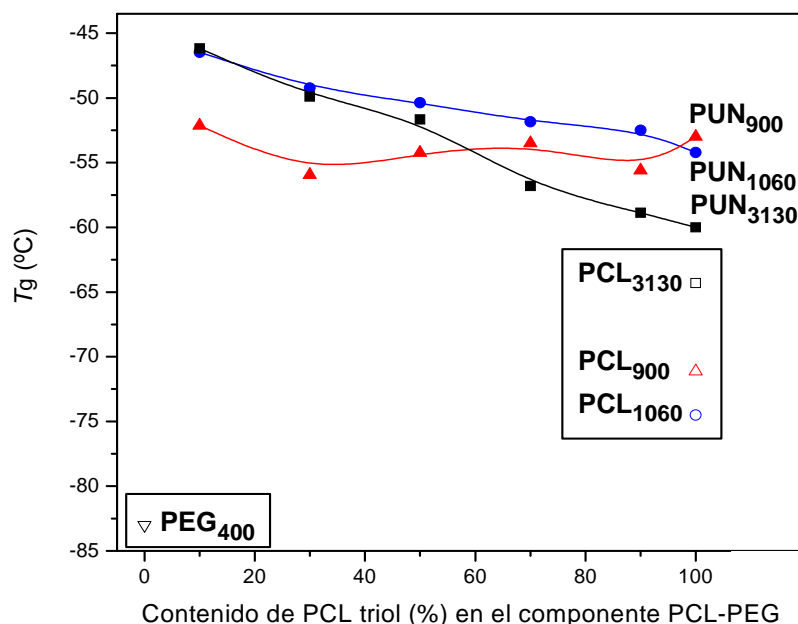


Figura 10.3: Variación de T_g de redes poliuretánicas en función del contenido de PCL triol de distintos pesos moleculares: PUN₉₀₀ (▲), PUN₁₀₆₀ (●) y PUN₃₁₃₀ (■). Se muestran también los valores de T_g de los polioles PCL triol de distinto peso molecular y PEG₄₀₀ (recuadros con símbolos abiertos).

El análisis de los termogramas de la Serie PUN₁₀₆₀ mostró claramente valores de T_g en el intervalo entre $-46,5$ y $-54,2$ °C. Estos valores resultaron, lógicamente, mayores a la T_g de PCL₁₀₆₀ ($-74,5$ °C), debido al efecto producido por el entrecruzamiento químico. La variación de capacidad calorífica aumentó con el incremento del componente difuncional (PEG₄₀₀). Los valores de T_g siguieron la tendencia mostrada en la **Figura 10.3**. La T_g se incrementó con el contenido de PEG₄₀₀, lo que puede atribuirse al aumento de la longitud de cadenas de $-(\text{PEG} - \text{HDI})_n-$. Los bloques uniformes de PEG y HDI se conectan a través de grupos uretano, por lo que el aumento en la longitud de estas cadenas conduce a una mayor interacción por puente de hidrógeno. La existencia de un número mayor de grupos uretano se evidenció en el espectro infrarrojo mostrado en la sección anterior. Si bien se produjo un aumento en la longitud de cadena entre puntos de entrecruzamiento químico, la aparición de una fracción mayor de entrecruzamiento físico reversible se reflejó en el incremento de la T_g . No se observaron picos endotérmicos correspondientes a la fusión de cristales de PCL₁₀₆₀ o PEG₄₀₀ (cuyas T_m se encuentran en $47,8$ °C y $6,5$ °C, respectivamente). Sólo se evidenció una

endoterma de fusión muy pequeña en el caso de P100-0, red que contiene únicamente unidades de PCL interconectadas con HDI.

Todas las redes de la Serie PUN₃₁₃₀ mostraron la señal correspondiente a la T_g en un intervalo mayor de temperatura, entre -46 y -60°C, valores superiores a la T_g de PCL₃₁₃₀ (-64,3 °C). Como en el caso de las redes de PCL₁₀₆₀, la variación de capacidad calorífica aumentó con el incremento de PEG₄₀₀. Sin embargo, los valores de T_g resultaron menores a los observados para la Serie PUN₁₀₆₀. En todos los materiales se observó una endoterma de fusión de cristales de PCL₃₁₃₀, aunque en P10-90 resultó poco apreciable. Los valores de T_m disminuyeron desde 54,3 °C (PCL₃₁₃₀) hasta 45,2 °C en P10-90. La presencia de la fase cristalina restringió la movilidad molecular e influyó en los valores de T_g observados. La extensión de la cristalinidad disminuyó con el incremento de la longitud de cadenas de -(PEG – HDI)_n-, y ambos factores condujeron a un aumento de la T_g . Los valores de T_g de ambas series (PUN₁₀₆₀ y PUN₃₁₃₀) coincidieron para las muestras P10-90, lo cual indica que con un bajo contenido de PCL, el comportamiento térmico de la red resulta independiente de la longitud de cadena de PCL triol (agente entrecruzante), siendo el entrecruzamiento físico el factor dominante.

En el caso de la Serie PUN₉₀₀ todos los materiales resultaron completamente amorfos, con valores de T_g relativamente constantes en el intervalo entre -53 y -56 °C (T_g PCL₉₀₀ = -71,1 °C). En esta serie no se evidenció en los valores de T_g la tendencia observada en las Series PUN₁₀₆₀ y PUN₃₁₃₀. Esto podría atribuirse a varios factores que indican una mayor heterogeneidad en las redes de PCL₉₀₀. Por una parte, los valores de T_m y cristalinidad de PCL₉₀₀ (21,8 °C, 14 %) resultaron menores que los obtenidos para PCL₁₀₆₀ (47,8 °C, 48 %). Por otra parte, como se ha determinado en otros productos comerciales similares (PCL diol de distintos pesos moleculares [14]), es muy posible que PCL₉₀₀ contenga restos de iniciador (glicerol) y menor cantidad de especies trisustituidas. Estas características contribuyen a la formación de una red con mayor inhomogeneidad.

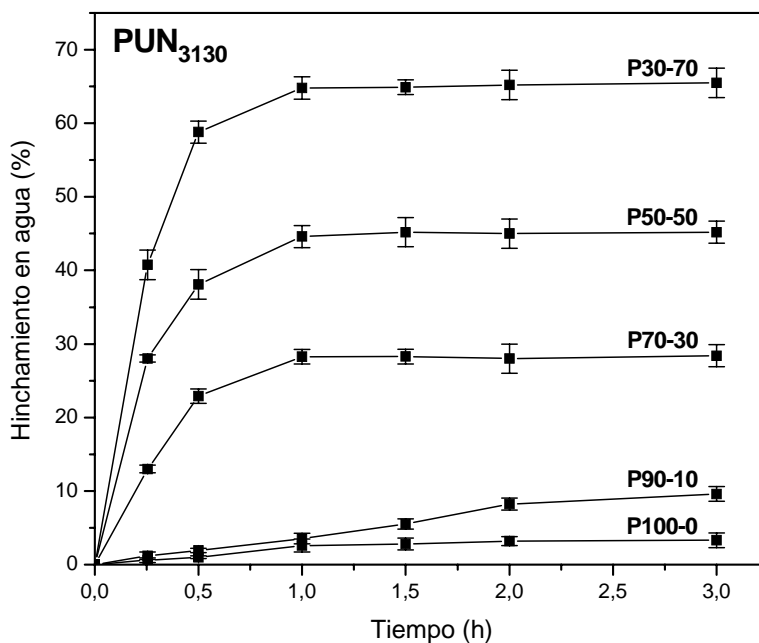
10.3.4 Cinética de absorción de agua

En la **Figura 10.4** se presentan las curvas de absorción de agua para las redes poliuretánicas de las Series PUN₃₁₃₀ y PUN₉₀₀, mientras que en la **Figura 10.5** se grafican los valores de hinchamiento de equilibrio en función de la composición para las

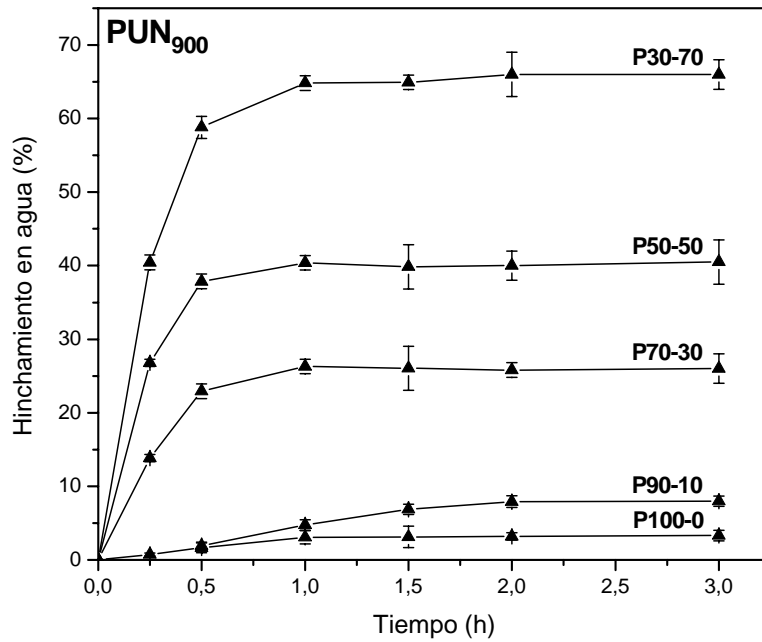
tres series. Como se mencionó en el proceso de extracción, un contenido de PEG₄₀₀ mayor al 70 % en peso en el componente hidroxilado condujo a la disgregación de las muestras. En consecuencia, no se pudo registrar el hinchamiento de las muestras P10-90.

Como se muestra claramente en la **Figura 10.5**, todas las series exhibieron valores de absorción de agua muy cercanos en el equilibrio. Los valores de hinchamiento de equilibrio resultaron moderados, siendo el mayor de 66 % para la formulación P70-30, y se alcanzaron en aproximadamente 1 hora. Además, en P100-0 y P30-70 estos valores resultaron idénticos. Esto refleja, como era de esperar, que la absorción de agua está controlada solamente por el contenido de componente hidrofílico y no depende de la longitud de cadena ni la cristalinidad del componente hidrofóbico.

A partir de las 3 horas se comenzó a evidenciar la fragmentación de algunos sistemas altamente hidrofílicos, como P30-70 (resultados no mostrados). Esto indicaría la solubilización de regiones con baja densidad de entrecruzamiento químico, o el comienzo de la degradación, proceso que ocurre por un mecanismo puramente hidrolítico favorecido por la presencia de enlaces éster, baja cristalinidad y elevado contenido de cadenas de $-(\text{PEG} - \text{HDI})_n-$ altamente hidrofílicas.



a)



b)

Figura 10.4: Curvas de absorción de agua a 37°C de las redes poliuretánicas PCL-PEG₄₀₀; a) Serie PUN₃₁₃₀, b) Serie PUN₉₀₀.

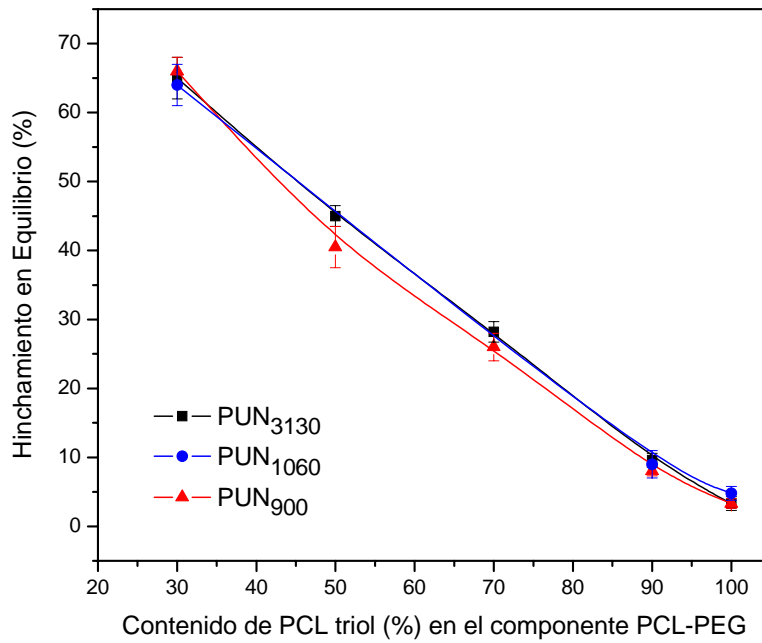


Figura 10.5: Valores de hinchamiento de equilibrio para las redes poliuretánicas PCL-PEG en función del contenido de PCL triol en el componente hidroxilado: PUN₉₀₀ (▲), PUN₁₀₆₀ (●) y PUN₃₁₃₀ (■).

10.4 Conclusiones parciales

Se sintetizaron satisfactoriamente tres series de redes poliuretánicas no segmentadas, constituidas por segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos biorreabsorbibles.

Las propiedades térmicas de las redes revelan que, si bien el incremento del contenido de PEG extendió la longitud de cadena entre puntos de entrecruzamiento químico, la mayor interacción por puente de hidrógeno en las cadenas de $-(\text{PEG} - \text{HDI})_n-$ producida por una mayor densidad de grupos uretano, contribuyó al aumento en el entrecruzamiento físico y el valor de T_g . Además, en el caso de la Serie PUN₃₁₃₀, la disminución de la cristalinidad de PCL también condujo a un aumento de la T_g . A bajo contenido de PCL (10%), el comportamiento térmico de la red resultó independiente de la longitud de cadena del agente entrecruzante, siendo el entrecruzamiento físico el factor dominante.

La absorción de agua en estos sistemas estuvo controlada por el contenido de componente hidrofílico y resultó independiente de la longitud de cadena y la cristalinidad del componente hidrofóbico. Las redes con alto contenido de PEG (> 70 % en peso del componente hidroxilado) se disgregaron en agua por solubilización parcial. Para redes con menor contenido de PEG se alcanzaron valores de hinchamiento de equilibrio de hasta 66 %.

Estos materiales resultan de interés para el diseño de matrices para ingeniería de tejidos con hidrofiliidad controlada, la cual puede explotarse para modular la liberación de principios bioactivos al medio biológico. Los resultados preliminares obtenidos justifican la continuación de estudios dirigidos a determinar la estabilidad hidrolítica y los perfiles de liberación de drogas modelo.

10.5 Referencias

- [1] Bruin P., Veenstra G.J., Nijenhuis A.J., Pennings A.J. Design and synthesis of biodegradable poly(ester-urethane) elastomer networks composed of non-toxic building blocks. *Macromol Rapid Commun*, 9 (8): 589–594, **1988**.
- [2] Bruin P., Smedinga J., Pennings A.J., Jonkman M.F. Biodegradable lysine diisocyanate-based poly(glycolide-co- ϵ -caprolactone)-urethane network in artificial skin. *Biomaterials*, 11 (4): 291–295, **1990**.

- [3] Storey R.F., Wiggins J.S, Puckett A.D. Hydrolyzable poly(ester-urethane) networks from L-lysine diisocyanate and D,L-lactide/ ϵ -caprolactone homo- and copolyester triols. *J Polym Sci Polym Chem*, 32 (12): 2345–2363, **1994**.
- [4] Zhang J.Y., Beckman E.J., Piesco N.P., Agarwal S. A new peptide-based urethane polymer: synthesis, biodegradation, and potencial to support cell growth *in vitro*. *Biomaterials*, 21 (12): 1247–1258, **2000**.
- [5] Zhang J., Doll B.A., Beckman E.J., Hollinger J.O. A biodegradable polyurethane-ascorbic acid scaffold for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part A*, 67A (2): 389–400, **2003**.
- [6] Bonzani I.C., Adhikari R., Houshyar S., Mayadunne R., Gunatillake P., Stevens M.M. Synthesis of two-component injectable polyurethanes for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 28 (3): 423–433, **2007**.
- [7] Guelcher S.A., Srinivasan A., Dumas J.E., Didier J.E., McBride S., Hollinger J.O. Synthesis, mechanical properties, biocompatibility, and biodegradation of polyurethane networks from lysine polyisocyanates. *Biomaterials*, 29 (12): 1762–1775, **2008**.
- [8] Phung H., Schacht E., Du Prez F., Gelan J., Adriaesens P., Storme L. Crosslinked polyurethane-based gels. *Polym Journal*, 35 (4): 353–358, **2003**.
- [9] Abraham G.A., Marcos-Fernández A., San Román, J. Bioresorbable poly(ester-ether urethane)s from L-lysine diisocyanate and triblock copolymers with different hydrophilic character. *J Biomed Mater Res Part A*, 76A (4): 729–736, **2006**.
- [10] Fromstein J.D., Woodhouse K.A. Elastomeric biodegradable polyurethane blends for soft tissue applications. *J Biomater Sci Polymer Edn*, 13 (4): 391–406, **2002**.
- [11] Cohn D., Stern T., Gonzalez M.F., Epstein J. Biodegradable poly-(ethylene oxide)/poly(ϵ -caprolactone) multiblock copolymers. *J Biomed Mater Res Part A*, 59A (2): 273–281, **2002**.
- [12] Sivak W.N., Pollack I.F., Petoud S., Zamboni W.C., Zhang J., Beckman E.J. Catalyst-dependent drug loading of LDI-glycerol polyurethane foams leads to different controlled release profiles. *Acta Biomater*, 4 (5): 1263–1274, **2008**.

[13] Chen, Q-Z., Bismarck A., Hansen U., Junaid S., Tran M.W., Harding S.E., Ali N.N., Boccaccini A.R. Characterization of a soft elastomer poly(glycerol sebacate) designed to match the mechanical properties of myocardial tissue. *Biomaterials*, 29 (1): 47–57, **2008**.

[14] A. Marcos-Fernández, G.A. Abraham, J.L. Valentín, J. San Román. Synthesis and characterization of biodegradable non-toxic poly(ester- urethane-urea)s based on poly(ϵ -caprolactone) and amino acid derivatives. *Polymer*, 47 (3): 785–798, **2006**.

CAPÍTULO 11

CONCLUSIONES FINALES

En esta tesis se estudiaron nuevos sistemas poliuretánicos biorreabsorbibles de interés en el campo biomédico, en particular para la preparación de filmes y matrices micro/nanofibrosas de aplicación en ingeniería de tejidos biológicos.

Se sintetizaron y caracterizaron satisfactoriamente los poliésteres poli(ϵ -caprolactona) diol y poli(ϵ -caprolactona) estrella con grupos terminales hidroxilo, y diferente funcionalidad y peso molecular. El análisis de la estructura química reveló la presencia de especies con diferente número de brazos, ya sea con el empleo de iniciadores que poseen grupos hidroxilo equivalentes (trietilenglicol y pentaeritritol), como no equivalentes (glicerol). La abundancia relativa de dichas especies dependió de la alimentación de la reacción.

Se sintetizaron satisfactoriamente tres nuevos extendedores de cadena difuncionales con grupos hidroxilo terminales y sus estructuras químicas y propiedades se caracterizaron completamente. Estos compuestos, con grupos funcionales urea-diol y diéster-difenol, presentaron fuertes interacciones intermoleculares y solubilidad en DMAc.

A partir de PCL diol, diisocianatos alifáticos (HDI o LDI) y los tres extendedores de cadena diseñados, se sintetizaron dos series de poliuretanos segmentados biorreabsorbibles, obteniendo materiales elastoméricos con morfologías de fases separadas. La reacción de polimerización y el grado de interacción entre las cadenas dependió de la naturaleza del diisocianato y del extendedor de cadena. Los extendedores de cadena y los segmentos duros impartieron características particulares a cada material. Termodinámicamente, los segmentos duros sintetizados con HDI exhibieron una menor tendencia a mezclarse con segmentos blandos de PCL que otros segmentos duros con HDI descritos en la literatura. Esto refuerza la hipótesis de que los extendedores de cadena diseñados favorecen la separación de fases.

Aunque son muchos los factores y las variables que determinan la morfología de los poliuretanos segmentados, la investigación del comportamiento de estos materiales y la interpretación de la relación estructura-morfología-propiedad es posible mediante una selección adecuada de variables y técnicas de análisis.

La variación de la composición de los segmentos duros (diisocianato y extendedor de cadena), permitió investigar la relación estructura-propiedades de los SPU. La diferente estructura química y simetría de los segmentos duros influyó en la separación de fases en dominios duros y blandos, como se evidenció en el comportamiento térmico de los materiales. La asociación de segmentos duros se incrementó con el diseño de segmentos constituidos por un diisocianato simétrico y/o extendedor de cadena simétrico. El rango de propiedades obtenidas con el empleo de diisocianatos no tóxicos y las modificaciones introducidas en la estructura de segmentos duros, permitió la preparación de biomateriales muy atractivos para aplicaciones en ingeniería de tejidos blandos.

Los estudios efectuados permitieron determinar algunas propiedades biológicas *in vitro* de los poliuretanos, mostrando baja adhesión y activación plaquetaria, baja formación de trombos y baja citotoxicidad, resultados que indican a priori la buena biocompatibilidad de estos materiales.

La preparación de matrices poliuretánicas micro/nanofibrosas pudo llevarse a cabo empleando la técnica de electrospinning. Una vez establecidas las condiciones experimentales y los parámetros de procesamiento se obtuvieron membranas con fibras uniformes y sin gotas. Las características propias de la técnica de procesamiento de membranas fibrosas condujeron a morfologías cristalinas diferentes. El desarrollo de estructuras semicristalinas a partir de microchorros de soluciones poliuretánicas es un proceso complejo, poco estudiado en la literatura. Las matrices presentaron una estructura altamente porosa, con poros interconectados, microestructura apropiada para aplicaciones biomédicas tales como ingeniería de tejidos blandos y liberación controlada de principios activos.

Los filmes poliuretánicos y matrices microporosas evidenciaron un comportamiento diferente en ambas series en los medios degradativos estudiados. La estructura química de los diisocianatos y extendedores de cadena tuvo un impacto significativo en la estabilidad hidrolítica y oxidativa de los SPU. La introducción de un extendedor de cadena con enlaces éster proporcionó sitios hidrolizables en los segmentos duros, que contribuyeron a la mayor degradación de los SPU. La morfología

fibrosa de las matrices electrohiladas influyó en la absorción de agua y en la velocidad de degradación observada en los diferentes medios. El diámetro promedio de fibra afectó la velocidad de degradación de las matrices electrohiladas.

Finalmente, se sintetizaron satisfactoriamente tres series de redes poliuretánicas no segmentadas, con distinto contenido de segmentos hidrofílicos de poli(etilenglicol) y segmentos hidrofóbicos biorreabsorbibles de PCL estrella de diferentes pesos moleculares y número de brazos. Las propiedades térmicas de las redes revelaron que, si bien el incremento del contenido de PEG extiende la longitud de cadena entre puntos de entrecruzamiento químico, la mayor interacción por puente de hidrógeno en las cadenas de $-(\text{PEG} - \text{HDI})_n-$ contribuyó al aumento del entrecruzamiento físico. La absorción de agua en estos sistemas estuvo controlada por el contenido del componente hidrofílico y resultó independiente de la longitud de cadena y la cristalinidad del componente hidrofóbico.

Trabajos de investigación futuros

El trabajo experimental realizado en esta tesis deja abierta la posibilidad de continuar profundizando algunos de los temas estudiados y explorar otros aspectos laterales.

La incorporación de segmentos blandos hidrofóbicos e hidrofílicos en la formulación de SPU permitiría el aumento de la hidrofiliidad del material así como la modificación de la velocidad de degradación.

En lo que respecta a la preparación de matrices fibrosas, la introducción de agentes porogénicos que incrementen el tamaño de poro obtenido por la técnica de electrospinning resulta de notable interés ya que se mantiene la estructura fibrosa que proporciona una característica biomimética valiosa. La generación de estructuras fibrosas tubulares elastoméricas para el desarrollo de prótesis vasculares de pequeño diámetro constituye otro aspecto de alto interés actual.

Los resultados de los estudios efectuados con las redes poliuretánicas justifican la continuación de estudios dirigidos a la preparación de matrices porosas mediante técnicas de eliminación de agentes porogénicos, la determinación de la estabilidad hidrolítica y los perfiles de liberación de drogas modelo.

ANEXOS

ANEXO I

Determinación de viscosidad intrínseca

La viscosidad de un polímero en solución es una propiedad muy interesante para la determinación del peso molecular. La viscosimetría capilar de Ubbelohde proporciona una técnica sencilla para la determinación de las viscosidades cinemática (ν), dinámica (η), relativa (η_r), específica (η_{sp}) e intrínseca $[\eta]$ (o viscosidad límite) de soluciones poliméricas.

La viscosidad cinemática (ν) se determina a partir de la constante del viscosímetro k y el tiempo (t) de escurrido del solvente o solución:

$$\nu = k \cdot t$$

La viscosidad dinámica (η) se obtiene a partir de ν y la densidad (δ) del solvente o solución:

$$\eta = \nu \cdot \delta$$

A su vez, la viscosidad relativa (η_r) de las soluciones poliméricas se calcula empleando los valores de viscosidad dinámica del solvente y la solución polimérica en cada caso, η_0 y η , respectivamente:

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0}$$

Por su parte, la viscosidad específica (η_{sp}) se determina a partir de la viscosidad relativa (η_r):

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \eta_r - 1$$

La viscosidad específica depende de la concentración. El número de viscosidad se define como:

$$\text{Número de viscosidad} = \frac{\eta_{sp}}{c_2}$$

Este valor indica la contribución del polímero a la viscosidad total. En un sistema ideal, η_{sp} / c_2 no es función de la concentración, pero una solución no es un sistema ideal y, por lo tanto, hay que extrapolar a concentración nula. Este resultado se denomina viscosidad intrínseca $[\eta]$:

$$[\eta] = \lim_{c_2 \rightarrow 0} (\eta_{sp} / c_2)$$

Para efectuar la extrapolación se debe conocer la dependencia de la viscosidad específica con la concentración. Huggins propuso una ecuación muy aproximada:

$$\frac{\eta_{sp}}{c_2} = [\eta] + k_1 \cdot [\eta]^2 \cdot c_2$$

Esta ecuación se aplica sólo a soluciones diluidas, generalmente del orden del 1 % p/v, para las que graficando η_{sp} / c_2 en función de la concentración permiten construir una recta cuya ordenada al origen es la viscosidad intrínseca, y cuya pendiente es también función de $[\eta]$: cuanto mayor es $[\eta]$, tanto más varía la pendiente con la concentración. El parámetro k_1 es una constante hidrodinámica denominada constante de Huggins.

La ecuación de Kraemer también nos aporta una fórmula válida para bajas concentraciones:

$$\frac{\ln \eta_r}{c_2} = [\eta] - k_2 \cdot [\eta]^2 \cdot c_2$$

La representación conjunta de las ecuaciones de Huggins y Kraemer en una misma gráfica da como resultado la confluencia de las rectas en una misma ordenada al origen, que es el valor de $[\eta]$.

La viscosidad intrínseca es la magnitud que se relaciona con el peso molecular promedio viscoso (M_v) de un polímero, mediante la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada: $[\eta] = K \cdot M_v^a$, donde K y a son dos parámetros constantes propios de cada par polímero-disolvente a la temperatura de trabajo y se calculan a partir del conocimiento de $[\eta]$ y del peso molecular determinado por otros procedimientos, como osmometría de membrana, difusión de luz, etc. Por ese motivo, el método viscosimétrico no es un método absoluto, ya que no nos da el peso molecular sino sólo a través de una ecuación

empírica que equivale a un calibrado. Independientemente de esto último, el valor de η_r o de $[\eta]$ nos permite tener una aproximación relativa para caracterizar los polímeros sintetizados.

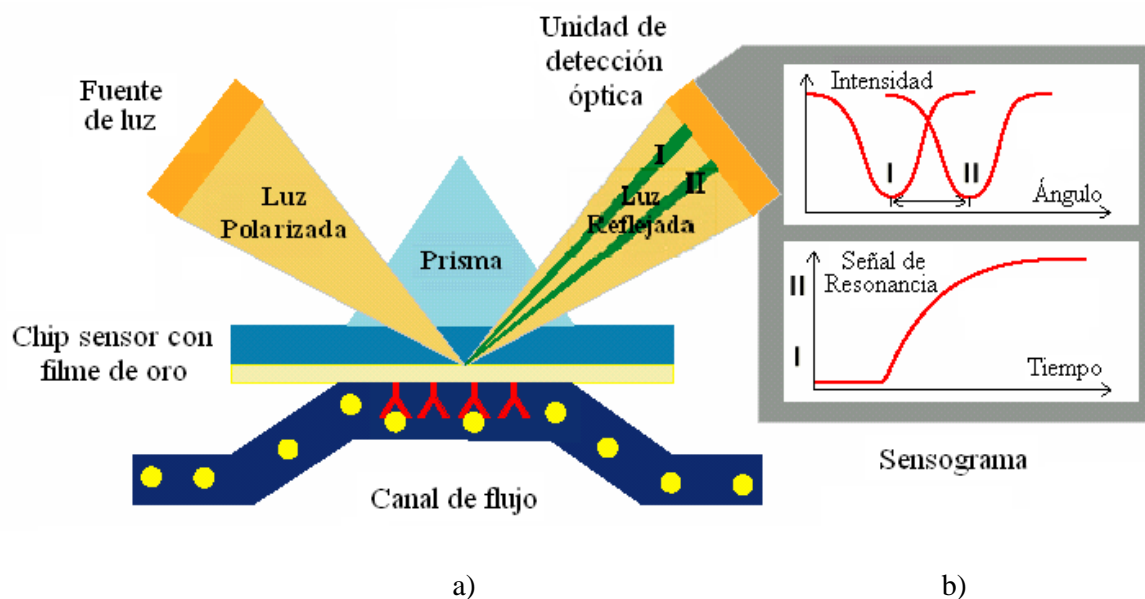
ANEXO II

Fundamentos de las técnicas experimentales empleadas en los ensayos *in vitro*

AII.1 Teoría de la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)

La técnica de SPR se basa en un fenómeno óptico asociado a la oscilación de densidad de carga en la interfase entre dos medios que poseen constantes dieléctricas de signos opuestos (por ejemplo un metal y un dieléctrico). La excitación óptica de un plasmón superficial se produce mediante una onda evanescente y se consigue cuando un rayo de luz incide en la interfase entre la capa metálica y el medio dieléctrico a un ángulo determinado, denominado ángulo de resonancia. La excitación del plasmón superficial provoca un descenso muy grande de la reflectancia del metal. Si se mide la intensidad del haz reflejado en función del ángulo de incidencia de la luz, se observa un mínimo muy pronunciado para el ángulo de resonancia. El ángulo de resonancia depende, en gran medida, del índice de refracción del medio colindante a la lámina metálica.

Para excitar una onda de plasmón superficial con una onda electromagnética incidente en la superficie se deben cumplir las condiciones de resonancia, es decir, que los vectores de propagación del plasmón superficial y de la onda electromagnética sean iguales. Los plasmones superficiales únicamente existirán si la permeabilidad eléctrica del metal y el medio dieléctrico son de signo contrario. Estas condiciones sólo se cumplen para frecuencias del infrarrojo o del visible con algunos metales. La elección del metal es crítica, ya que debe presentar electrones libres. Los metales más apropiados son la plata, el oro, el cobre y el aluminio siendo los dos primeros los más comúnmente utilizados. La plata, porque proporciona picos de resonancia muy agudos y el oro por su estabilidad. En general los plasmones superficiales se producen con frecuencias del rango del visible con grandes pérdidas a longitudes de onda mayores (infrarrojo). La determinación del espesor óptimo de la capa metálica es fundamental para obtener el valor mínimo de reflectancia, y depende de las constantes ópticas del metal y de la longitud de onda de la luz. Existen dos formas de excitar ópticamente y alcanzar las condiciones de resonancia: mediante reflexión total con estructuras prismáticas acopladas o empleando redes de difracción. La primera es la más utilizada debido a su simplicidad y se denomina configuración Kretschmann (**Esquema AII.1**).



Esquema AII.1: a) Configuración de Kretschmann de un equipo de SPR; b) Ejemplos típicos de curvas de SPR, antes (I) y después (II) de adsorción proteica.

El ángulo de resonancia es muy sensible a los cambios que se producen en el índice de refracción en las proximidades de la superficie metálica, como por ejemplo, producto de una interacción química (**Esquema AII.1**).

El ángulo de resonancia depende de la longitud de onda incidente, del índice de refracción del prisma, del metal y de la capa de muestra que se desea detectar. Si únicamente la última cambia, la SPR puede utilizarse para monitorear cambios en el índice de refracción de las capas adsorbidas en la superficie metálica. Los cambios en el índice de refracción pueden relacionarse con variaciones de masa y, por lo tanto, con interacciones específicas entre las moléculas de analito depositadas previamente en la superficie metálica y sus receptores específicos.

Cuando se utiliza luz monocromática para excitar la respuesta de la SPR, existen dos formas de medirla: seguir la variación del ángulo de resonancia acoplado o seguir la intensidad de la luz reflejada a un ángulo fijo. En este trabajo se empleó el primer método. El segundo método sólo puede utilizarse cuando los cambios en el índice de refracción son muy pequeños. Además del monitoreo *in situ* de las interacciones, se puede obtener información acerca de la especificidad, concentración y cinética de dichas interacciones.

AII.1.1 Aplicaciones de la SPR

Las aplicaciones de esta técnica son numerosas y en continuo aumento [1]. Caben destacar el estudio de las propiedades ópticas de una capa metálica, medidas de espesor de filmes y de índices de refracción de capas orgánicas sobre superficies metálicas [2], estudio de la adsorción de proteínas a biomateriales [3], medidas de interacciones moleculares específicas, tales como reacciones inmunológicas, interacciones virus-proteína e hibridación de ADN, entre otras. En un contexto más general, la SPR ha resultado útil en aplicaciones medioambientales, determinación de contaminantes orgánicos, aplicaciones biotecnológicas, médicas, clínicas, en genómica funcional y en proteómica.

AII.1.2 Referencias

[1] Green R.J., Frazier R.A., Shakesheff K.M., Davies M.C., Roberts C.J., Tendler S.J.B. Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials*, 21 (18): 1823–1835, **2000**.

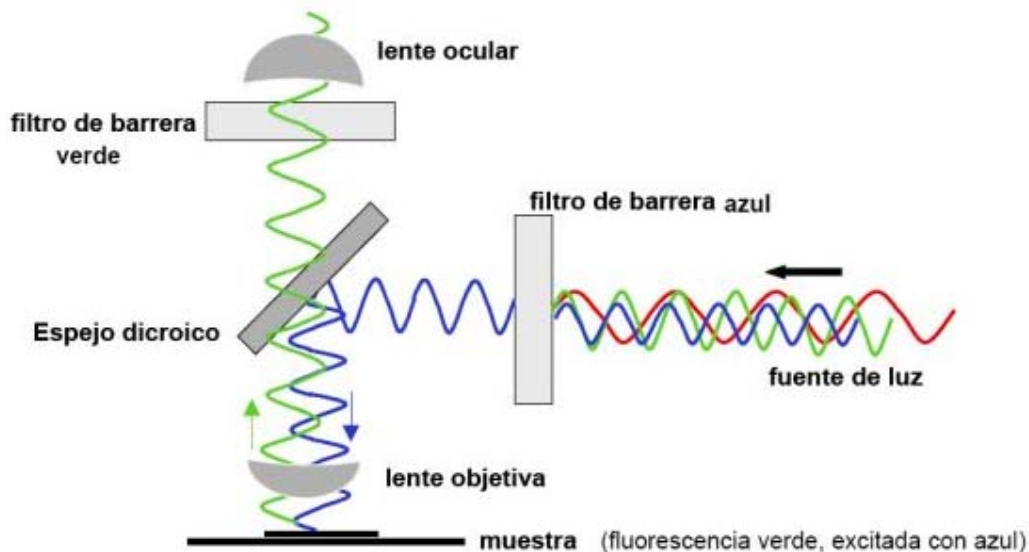
[2] Corneillie S., Ngoc L.P., Schacht E., Davies M., Shard A., Green R., Denyer S., Wassall M., Whitfield H., Choong S. Polyethylene glycol-containing polyurethanes for biomedical applications. *Polym Int*, 46 (3): 251–259, **1998**.

[3] Green R.J., Davies M.C., Roberts C.J., Tendler S.J.B. Competitive protein adsorption as observed by surface plasmon resonance. *Biomaterials*, 20 (4): 385–391, **1999**.

AII.2 Microscopía de Epifluorescencia

Los *fluorocromos* son sustancias que tienen la propiedad de emitir un fotón de una longitud de onda determinada cuando son excitados por un fotón incidente de una longitud de onda característica. La parte de la molécula que emite la fluorescencia se denomina *fluoróforo*. Las moléculas de fluorocromo se utilizan para marcar ciertas estructuras celulares, destacándolas del resto de los elementos que componen la célula. Esto permite identificar distintas moléculas o conjuntos de moléculas. El fluorocromo puede tener afinidad por distintos elementos celulares o puede ser acoplado

químicamente a otras moléculas como anticuerpos que reconocen específicamente cierto componente celular.



Esquema AII.2: Funcionamiento de un microscopio de epifluorescencia.

La microscopía de epifluorescencia es una técnica que emplea un microscopio diseñado para el uso de diferentes tipos de luz (blanca, ultravioleta, azul, verde, etc., dependiendo del filtro utilizado). El funcionamiento del microscopio de epifluorescencia se explica en el **Esquema AII.2**. La radiación procedente de la fuente atraviesa un primer filtro que selecciona la longitud de onda capaz de excitar al fluorocromo, antes de incidir sobre la muestra. Esta luz se refleja en un espejo dicromático (o dicroico) e incide sobre la muestra, excitando al fluorocromo, el que emite fotones de una longitud de onda mayor que la incidente. La luz emitida por la muestra no se refleja sino que atraviesa el espejo dicroico y llega a un segundo filtro que selecciona la longitud de onda de emisión del fluorocromo, pasando a través del ocular para ser vista por el observador. Finalmente, la luz ingresa a un fotomultiplicador que la convierte en una señal eléctrica.

La observación por epifluorescencia se basa en la coloración que adquieren las partículas observadas (en algunas ocasiones inapreciables de otro modo) al ser excitadas con radiación de una longitud de onda específica. La muestra puede o no teñirse con un colorante específico. En nuestro trabajo se empleó tinción con naranja de acridina.

De esta manera, la epifluorescencia resulta de utilidad para el análisis de superficies de biomateriales en los que se puede observar el depósito de células, como

por ejemplo la adhesión y agregación plaquetaria, eventos relacionados con la hemocompatibilidad de las superficies.

AII.2.1 Referencias

[1] <http://iie.fing.edu.uy/investigacion/grupos/gti/timag/trabajos/2007/proteus/epifluorescencia.html>

[2] <http://www.unicosci.com/espanol/micro/h606.htm>

AII.3 Método ELISA

El ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzima o ELISA (*Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay*) es una técnica de ensayo inmunoenzimático (EIA o *Enzyme-ImmunoAssay*) que permite la detección tanto de antígenos como de anticuerpos. Además de esto, tiene aplicaciones en la detección de otras sustancias como lo son: drogas, enzimas, hormonas, antibióticos y metabolitos, entre otros.

El ELISA se basa en la premisa de que un inmunoreactivo puede ser inmovilizado en una fase sólida y su reactivo recíproco puede unirse a una enzima; en ambos casos las sustancias retienen su actividad inmunológica donde la reacción inmunógeno-anticuerpo es monitoreada midiendo la actividad de una enzima.

Hay diversos tipos de ELISA: directo, indirecto, de competencia y de sandwich. En este trabajo se ha empleado el método ELISA de sandwich, debido a su elevada objetividad, sensibilidad y especificidad (debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo), la buena estabilidad de sus reactivos, su automatización y a que no requiere de equipos caros ni muy sofisticados. El ELISA de sandwich también es conocido como ELISA de captura, dado que en el mismo se captura un antígeno y se detecta mediante la utilización de inmunocomplejos. Los pasos que involucra un ELISA de sandwich o de captura son (**Figura AII.1**):

1. Se cubre el pocillo con un primer anticuerpo que detectará el antígeno presente en la muestra.
2. Se añade la muestra problema, y si el antígeno está presente será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo.
3. Se agrega un segundo anticuerpo anti-antígeno.
4. Se añade una enzima que se une al segundo anticuerpo.

5. Se le agrega el sustrato, el cual será convertido por la enzima en un producto detectable al espectrofotómetro de ELISA.

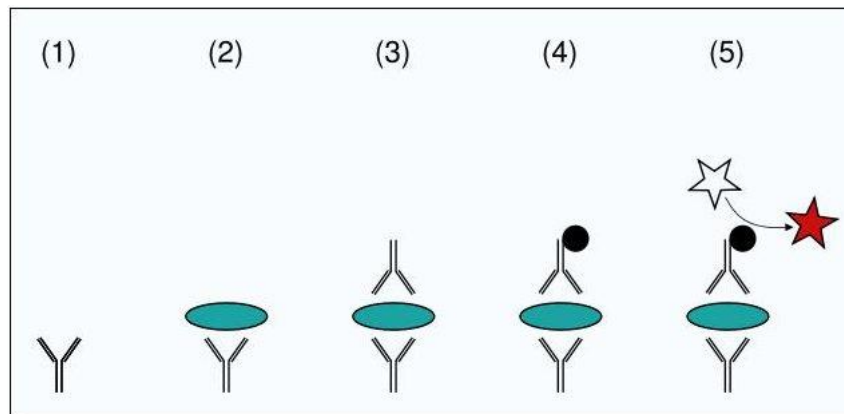


Figura AII.1: Pasos para la realización de un ELISA sandwich.

AII.3.1 Referencias

- [1] <http://www.telmeds.org/modules.php?name=News&file=article&sid=495>
- [2] CD62P (sP-selectin) ELISA KIT, *Trail R2/DR5 ELISA KIT*, 4: p. 1-6, 2008.

AII.4 Tinción de Giemsa

La tinción de Giemsa es un método habitual para el examen de frotis sanguíneos (estudio que brinda información sobre el número y forma de las células sanguíneas a través de la observación al microscopio) y otro tipo de muestras biológicas, que permite la tinción diferencial de zonas con un alto contenido de ADN. Es específica para los grupos fosfato de ADN y se une a regiones con elevadas cantidades de uniones adenina-timina. Esto permite distinguir perfectamente al microscopio óptico el núcleo celular, los cromosomas durante la mitosis, y en algunos casos, incluso el ADN mitocondrial.

La tintura Giemsa es una mezcla de azul B, eosina y azul de metileno. La técnica radica en la disociación controlada de las sales de eosinato que ocurre al insolubilizar la mezcla por disolución en H₂O destilada; la eosina así liberada colorea el componente extracelular y determinadas estructuras acidófilas; y los derivados de azul, las estructuras de carácter basófilo. Las diferentes coloraciones obtenidas se detallan en la **Tabla AII.1**.

Tabla AII.1. Coloraciones esperadas empleando solución amortiguadora de fosfatos a pH 6,8.

Tipo de célula	Tinción de Giemsa
Núcleos	rojo a violeta
Linfocitos	plasma azul
Monocitos	plasma azul de paloma
Granulocitos neutrófilos	gránulos violeta claro
Granulocitos eosinófilos	gránulos rojo a azul grisáceo
Granulocitos basófilos	gránulos violeta oscuro
Trombocitos	violeta
Eritrocitos	rojizo
Plaquetas	rosa pálido
Parásitos sanguíneos	núcleos rojo claro

El típico color de los núcleos celulares, mayoritariamente rojo púrpura, se basa en la interacción molecular eosina y un complejo azul B – ADN. Ambos colorantes forman el complejo. La intensidad de la coloración depende del contenido de azul B y de la relación entre azul B y eosina amarilla. El resultado de tinción puede ser influido por diversos factores, tales como el valor del pH de la solución, las sustancias amortiguadoras empleadas, el tiempo de tinción y fijación.

AII.4.1 Referencias

[1] Shapiro H.M., Mandy F. Cytometry in malaria: moving beyond Giemsa. *Cytom Part A*, 71 (9): 643–645, **2007**.

[2] http://www.impact-malaria.com/FR/EPS/Formations_et_cours_internationaux/Formation_de_la_Liverpool_School_LSTMH/cours_liverpool/Unit_4/4_2_2_2.html.

[3] <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003665.htm>