

Miguel Lomba Huguet

Estrategias de fotorreticulación alternativas a la fotopolimerización de acrilatos para la preparación de materiales microestructurados de uso en aplicaciones biomédicas

Departamento
Química Orgánica

Director/es

Oriol Langa, Luis
Sánchez Somolinos, Carlos

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

ESTRATEGIAS DE FOTORRETICULACIÓN
ALTERNATIVAS A LA FOTOPOLIMERIZACIÓN DE
ACRILATOS PARA LA PREPARACIÓN DE
MATERIALES MICROESTRUCTURADOS DE USO
EN APLICACIONES BIOMÉDICAS

Autor

Miguel Lomba Huguet

Director/es

Oriol Langa, Luis
Sánchez Somolinos, Carlos

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Química Orgánica

2012



**Universidad
Zaragoza**

TESIS DOCTORAL

***ESTRATEGIAS DE FOTORRETICULACIÓN
ALTERNATIVAS A LA FOTOPOLIMERIZACIÓN DE
ACRILATOS PARA LA PREPARACIÓN DE
MATERIALES MICROESTRUCTURADOS DE USO
EN APLICACIONES BIOMÉDICAS***

MIGUEL LOMBA HUGUET

Dpto. de Química Orgánica

Facultad de Ciencias-ICMA

Universidad de Zaragoza-CSIC

Zaragoza, octubre de 2012

TESIS DOCTORAL

***ESTRATEGIAS DE FOTORRETICULACIÓN
ALTERNATIVAS A LA FOTOPOLIMERIZACIÓN DE
ACRILATOS PARA LA PREPARACIÓN DE
MATERIALES MICROESTRUCTURADOS DE USO
EN APLICACIONES BIOMÉDICAS***

*Memoria presentada en la Universidad de Zaragoza para
optar al grado de Doctor en Ciencias por*

MIGUEL LOMBA HUGUET

Dpto. de Química Orgánica

Facultad de Ciencias-ICMA

Universidad de Zaragoza-CSIC

Zaragoza, octubre de 2012

D. LUIS T. ORIOL LANGA, Profesor Titular del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias, perteneciente al Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón de la Universidad de Zaragoza-CSIC y D. CARLOS SÁNCHEZ SOMOLINOS, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas del Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón de la Universidad de Zaragoza-CSIC,

HACEN CONSTAR:

Que el trabajo original titulado “ESTRATEGIAS DE FOTORRETICULACIÓN ALTERNATIVAS A LA FOTOPOLIMERIZACIÓN DE ACRILATOS PARA LA PREPARACIÓN DE MATERIALES MICROESTRUCTURADOS DE USO EN APLICACIONES BIOMÉDICAS”, ha sido realizado bajo nuestra supervisión por D. MIGUEL LOMBA HUGUET en el Departamento de Química Orgánica y en el Departamento de Física de la Materia Condensada de la Facultad de Ciencias, pertenecientes al Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón de la Universidad de Zaragoza-CSIC y reúne las condiciones para su presentación como tesis doctoral.

Zaragoza, a 3 de octubre de 2012

Fdo.: Dr. Luis T. Oriol Langa

Fdo.: Dr. Carlos Sánchez Somolinos

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento al personal de los distintos equipos a los que he tenido acceso para llevar a cabo los diferentes experimentos. Quisiera agradecerles tanto su experiencia y profesionalidad, que han hecho posible la obtención de resultados, como su dedicación y disponibilidad, que me han permitido aprender sobre áreas de conocimiento distintas de la química que eran nuevas para mí.

Quisiera también agradecer a la gente de los distintos grupos con los que he colaborado. En primer lugar por su apoyo, muy útil cuando trabajas en un laboratorio al que no estás acostumbrado, y en segundo lugar por su simpatía, que me ha hecho sentirme muy a gusto tocando donde tocaba trabajar cada día. En concreto, agradezco su apoyo al personal del grupo de *Física de la Materia Condensada* de la Universidad de Zaragoza, al grupo *Bionanosurf* del Instituto de Nanociencia de Aragón y a la *Unidad de Microscopía e Imagen* del Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón.

Quisiera agradecer a todos los becarios de químicas en general por los ratos de ocio y las cenas interdepartamentales, fundamentales para liberar estrés y volver el lunes con más fuerza al laboratorio. También a todos los que han pasado por los “*Deskansaos*”, que aun siendo un poco banda al final hemos conseguido ganar la liga (lástima del jamón y no haber ganado la liga un poquito antes para haberla disfrutado más). Y sobre todo agradecer al grupo de cristaleros (a los que hubo y a los que hay) el buen rollo que ha habido en el laboratorio durante estos años. La verdad que ha sido un placer trabajar en este grupo y os voy a echar mucho de menos.

Igualmente, agradecer a todos los compañeros del Centro Tecnológico de Miranda de Ebro (y especialmente a mis compañeras del área de Materiales) que me han

acogido muy calurosamente y hace que sea más fácil esto del pluriempleo en los últimos meses de tesis.

Quiero agradecer también a la gente que me ha dirigido la tesis o ha colaborado activamente en ella por su esfuerzo, y transmitirles que me siento satisfecho y orgulloso del trabajo realizado entre todos. Aquí me gustaría también mencionar a María Moros del INA que, aunque no me ha dirigido como tal, ha mostrado una gran dedicación e interés para enseñarme en mis primeros pasos como “bioquímico”. También a Berta, Valeria y Jesús Martínez cuya aportación a este trabajo ha sido fundamental. Por último agradecer a mis directores de tesis, Carlos y Luis, no solo por su labor como directores del trabajo sino como tutores, lo cual agradezco y valoro muchísimo.

Quisiera agradecer a las organizaciones correspondientes por la financiación económica que ha hecho posible este trabajo y que ha provenido principalmente del Gobierno de Aragón (Beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador y proyectos PI018/08 y Proyecto ARAID para jóvenes Investigadores) y del Ministerio de Ciencia e Innovación (proyectos MAT2008-06522-C02 y MAT2011-27978-C02).

Finalmente quisiera agradecer a mi familia y a mi novia. A mi familia por haberme soportado más que nadie en los malos ratos, y porque a pesar de ello han tenido la paciencia necesaria para darme todo su apoyo. A Silvi porque su sonrisa ha hecho que cualquier día empiece y acabe genial; porque su preocupación y cariño ha conseguido alegrarme en los malos momentos, y porque su alegría me ha hecho disfrutar más que nunca de los buenos. Te quiero muchísimo, eres una de las razones por la que más me alegro de haber hecho la tesis en la tercera.

1. ANTECEDENTES	1
1.1. BIOMATERIALES	3
1.1.1. APLICACIONES MÉDICAS DE LOS BIOMATERIALES	4
1.1.1.1. Liberación controlada de fármacos	6
1.1.1.2. Ingeniería de Tejidos	8
1.1.2. POLÍMEROS COMO BIOMATERIALES	10
1.1.2.1. Polímeros sintéticos	11
BIOESTABLES	12
BIODEGRADABLES	12
1.1.2.2. Polímeros naturales	17
PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS	17
POLISACÁRIDOS	19
1.2. FOTOPOLIMERIZACIÓN Y ESTRUCTURACIÓN CON LUZ	21
1.2.1. REACCIONES DE FOTOPOLIMERIZACIÓN	21
1.2.1.1. Fotopolimerización de tiol-enos y tiol-inos	23
MECANISMO DE LA FOTOPOLIMERIZACIÓN DE TIOL-ENOS Y TIOL- INOS	25
CARACTERÍSTICAS DE LA FOTOPOLIMERIZACIÓN DE TIOL-ENOS Y TIOL-INOS	27
1.2.1.2. Fotopolimerización por descomposición de sales de diazonio	28
1.2.2. MICROESTRUCTURACIÓN DE FOTOPOLÍMEROS	30
1.2.2.1. Fotolitografía	31
1.2.2.2. Técnicas de escritura láser	33
1.2.2.3. Otras técnicas de microestructuración de fotopolímeros	36
1.3. BIOMATERIALES BASADOS EN FOTOPOLÍMEROS .	39

1.3.1. FOTOPOLIMERIZACIÓN RADICALARIA DE ACRILATOS EN BIOMATERIALES.....	40
1.3.1.1. Fotopolimerización de polímeros sintéticos.....	40
1.3.1.2. Fotopolimerización de polímeros naturales.....	44
1.3.1.3. Estructuración con luz de fotopolímeros acrílicos en biomateriales	47
1.3.2. FOTOPOLIMERIZACIÓN POR REACCIÓN DE TIOL-ENOS EN BIOMATERIALES.....	51
2. OBJETIVOS	61
2.1. SALES DE DIAZONIO	63
2.2. TIOLINOS	65
3. FOTORRETICULACIÓN DE POLÍMEROS MODELO CON UNA SAL DE DIAZONIO TRIFUNCIONAL	67
3.1. INTRODUCCIÓN	69
3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	72
3.2.1. SÍNTESIS DEL RETICULANTE.....	72
3.2.2. INTERACCIÓN DENTRE EL RETEICULANTE Y LOS POLÍMEROS EN DISOLUCIÓN	75
3.2.3. PROCESADO Y ESTABILIDAD TÉRMICA DE LAS PELÍCULAS.....	77
3.2.4. FOTORRETICULACIÓN DE LOS POLÍMEROS MODELO.....	82
3.2.5. ESTRUCTURACIÓN CON LUZ.....	87
3.3. RESUMEN	89
3.4. EXPERIMENTAL.....	90
3.4.1. MATERIALES.....	90
3.4.2. PREPARACIÓN DEL RETICULANTE.....	90
3.4.3. PREPARACIÓN DE FORMULACIONES Y ESTUDIOS DE PRECIPITACIÓN.....	91

3.4.4. PREPARACIÓN DE PELÍCULAS FOTORRETICULABLES	92
3.4.5. PROCESO DE FOTORRETICULACIÓN	93
3.4.6. TÉCNICAS	94

4. FOTORRETICULACIÓN DE HIALURONATO DE SODIO CON UNA SAL DE DIAZONIO TRIFUNCIONAL

95

4.1. INTRODUCCIÓN

97

4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

101

4.2.1. FOTORRETICULACIÓN DEL HIALURONATO DE SODIO

101

4.2.2. ESTUDIOS DE BIOCMPATIBILIDAD

106

4.2.3. ESTRUCTURACIÓN CON LUZ.....

108

4.2.4. ESTUDIOS DE ADHESIÓN CELULAR

111

4.3. RESUMEN

124

4.4. EXPERIMENTAL.....

126

4.4.1. MATERIALES.....

126

4.4.2. PREPARACIÓN DE PELÍCULAS FOTORRETICULABLES

128

4.4.3. PROCESO DE FOTORRETICULACIÓN

129

4.4.4. ESTUDIOS DE BIOCMPATIBILIDAD

129

4.4.5. ESTUDIOS DE ADHESIÓN CELULAR

130

4.4.6. TÉCNICAS

133

5. FOTORRETICULACIÓN DE POLIÉSTERES ALIFÁTICOS CON UNA SAL DE DIAZONIO TRIFUNCIONAL

135

5.1. INTRODUCCIÓN

137

5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

139

5.2.1. SÍNTESIS DE LOS POLIÉSTERES HIPERRAMIFICADOS CON GRUPOS SULFONATO	139
5.2.2. PREPARACIÓN DE PELÍCULAS Y PROCESO DE FOTORRETICULACIÓN....	143
5.2.3. ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD	146
5.2.4. ESTRUCTURACIÓN CON LUZ.....	150
5.2.5. ESTUDIOS DE ADHESIÓN CELULAR	151
5.3. RESUMEN	154
5.4. EXPERIMENTAL.....	155
5.4.1. MATERIALES.....	155
5.4.2. SÍNTESIS DE LOS POLIÉTERES HIPERRAMIFICADOS CON GRUPOS SULFONATO	156
5.4.3. PREPARACIÓN DE PELÍCULAS FOTORRETICULABLES	158
5.4.4. PROCESO DE FOTORRETICULACIÓN	158
5.4.5. ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD	159
5.4.6. ESTUDIOS DE ADHESIÓN CELULAR	159
5.4.7. TÉCNICAS	159
6. FOTORRETICULACIÓN DE POLIÉSTERES ALIFÁTICOS POR QUÍMICA DE TIOL-INOS ...	161
6.1. INTRODUCCIÓN	163
6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	167
6.2.1. SÍNTESIS DE LOS MACROMONÓMEROS	167
6.2.2. PROCESO DE FOTORRETICULACIÓN	173
6.2.3. ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD	182
6.2.4. ESTRUCTURACIÓN CON LUZ.....	183
6.2.5. ESTUDIOS DE ADHESIÓN CELULAR	186
6.3. RESUMEN	201
6.4. EXPERIMENTAL.....	203

6.4.1. MATERIALES.....	203
6.4.2. SÍNTESIS DE LOS MACROMONÓMEROS	204
6.4.3. PREPARACIÓN DE PELÍCULAS FOTORRETICULABLES	205
6.4.4. FOTORRETICULACIÓN DE LOS MACROMONÓMEROS	206
6.4.5. ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD	206
6.4.6. ESTUDIOS DE ADHESIÓN CELULAR	206
6.4.7. TÉCNICAS	207
7. CONCLUSIONES	209

1. ANTECEDENTES

1.1. BIOMATERIALES

En las últimas décadas la Medicina ha evolucionado de forma tal que se ha adquirido un conocimiento más profundo de los procesos biológicos involucrados en el desarrollo y la curación de enfermedades a nivel molecular. De esta forma se puede influir en ellos favoreciendo un determinado proceso curativo, un proceso de regeneración tisular o evitando la aparición de una determinada enfermedad, utilizando para ello metodologías aplicadas en la Biología, la Química o la Física. Muchos autores definen esta aproximación como Biomedicina. Para ello, algunas áreas de la Medicina han hecho uso de materiales que pueden ser introducidos en el cuerpo e interactuar con él, influyendo así en estos procesos biológicos. Estos materiales se conocen con el nombre de biomateriales.

Un biomaterial ha de ser biocompatible, es decir, no ha de provocar respuesta adversa en el organismo (por ejemplo inflamatoria). En ocasiones se busca que este material sea bioactivo de forma que tenga un efecto en el tejido vivo. Esta bioactividad, que está influida por la composición química del material, ha de modularse dependiendo de la aplicación final. La variedad en cuanto a las posibles aplicaciones de estos materiales hace que se haya estudiado en profundidad con el objetivo de optimizarlos para las diferentes aplicaciones médicas.^{1, 2}

¹ Park, J.B., Bronzino, J.D. (Editors). *Biomaterials: Principles and Applications*. CRC Press, Florida, USA, 2000.

² Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. (Editors). Biomaterials in Tissue Engineering. *Principles of Tissue Engineering, 3rd Edition*. Elsevier Academic Press, San Diego, USA, 2007, p.263-359.

1.1.1. APLICACIONES MÉDICAS DE LOS BIOMATERIALES

El uso de biomateriales, entendidos como materiales que interaccionan con el cuerpo humano, no es reciente tal y como lo demuestra por ejemplo el uso desde la antigüedad de prótesis metálicas para implantes y piezas dentales. No obstante es ya en el siglo XX cuando el campo de los biomateriales experimenta un gran auge gracias al avance en la Ciencia de Materiales. Esto permite diseñar biomateriales específicos para una determinada aplicación (en vez de ser una adaptación de un material ya existente) y fabricar por lo tanto dispositivos médicos mucho más adecuados a su finalidad.

El campo de aplicación de los biomateriales es en la actualidad muy amplio, y son diversas las disciplinas de la Medicina que se han aprovechado de los nuevos avances en Ciencia de Materiales ya sea en el ámbito de los materiales metálicos, cerámicos (biocerámicas), poliméricos o composites. Así, por ejemplo, se han utilizado nuevos materiales biocompatibles para recubrir compuestos magnéticos o radiactivos que pueden ser transportados por el cuerpo humano sin provocar respuesta inmune.³ De esta forma pueden ser monitorizados en su recorrido por el cuerpo humano, siendo de gran utilidad en el diagnóstico de enfermedades o para seguir rutas metabólicas. Además, la incorporación de ligandos específicos a estos agentes de contraste ha permitido localizarlos en receptores presentes en determinados órganos o tejidos del cuerpo humano. Estos agentes de contraste son una herramienta muy útil, por ejemplo, para detectar tejidos dañados incluso antes de que aparezcan los síntomas de la enfermedad.

Otras disciplinas como la Cirugía también se han beneficiado de la aparición de biomateriales, especialmente de los biomateriales poliméricos. Con este tipo de

³ Kim, J.H., Park, K., Nam, H.Y., Lee, S., Kim, K., Kwon, I.C. *Prog. Polym. Sci.*, **2007**, 32, 1031-1053.

materiales se han fabricado suturas que pueden degradarse y ser absorbidas por el cuerpo humano evitando así una posterior intervención quirúrgica para retirarlas y que permiten además incorporar biomoléculas que favorecen la cicatrización de la herida.⁴

La fabricación de piezas para implantes o prótesis también se ha beneficiado del desarrollo de biomateriales para mejorar los tradicionales implantes metálicos. De esta forma se han podido fabricar dispositivos de polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE) con una gran capacidad de absorción de impacto y bajo coeficiente de fricción que se utilizan como acetábulos en prótesis de cadera,⁵ o implantes de poliuretano con una gran estabilidad para la fabricación de válvulas cardíacas y tubos sanguíneos.⁶ También se han usado formulaciones polimerizables *in vivo* como los cementos acrílicos que sirven para fijar el implante al hueso y evitar así posibles desplazamientos.⁷ Diversos composites porosos como las cerámicas se han utilizado para favorecer la integración del implante en el tejido que lo rodea.⁸

Dos campos que han adquirido una gran importancia en la Medicina actual son la liberación controlada de fármacos y la Medicina Regenerativa. Estas dos disciplinas requieren materiales con unas propiedades físico-químicas muy bien definidas como el tiempo de degradación, la morfología, las propiedades mecánicas o la incorporación de diversas moléculas que interaccionen específicamente con el cuerpo para cumplir una determinada función dentro del mismo. Es por esto que el diseño de materiales para estas aplicaciones es un proceso complejo que está siendo ampliamente investigado en

⁴ Boateng, J.S., Matthews, K.H., Stevens, H.N.E., Eccleston, G.M. *J. Pharm. Sci.*, **2008**, *97*, 2892-2923.

⁵ Kurtz, S.M. (Editor). *The UHMWPE Handbook: Ultra-High Molecular Weight Polyethylene in Total Joint Replacement*. Elsevier, London, **2004**.

⁶ Gunatillake, P.A., Martin, D.J., Meijs, G.F., McCarthy, S.J., Adhikari, R. *Aust. J. Chem.*, **2003**, *56*, 545-557.

⁷ Lewis, G. *J. Biomed. Mater. Res. B*, **2008**, *84*, 301-319.

⁸ Mastrogiacomo, M., Muraglia, A., Komlev, V., Peyrin, F., Rustichelli, F., Crovace, a., Cancedda, R. *Orthod. Craniofacial Res.*, **2005**, *8*, 277-284.

la actualidad. A continuación se comentarán brevemente estos campos en los que los materiales poliméricos han adquirido especial relevancia.

1.1.1.1. Liberación controlada de fármacos

Todo fármaco tiene un intervalo de concentraciones en el que resulta eficaz. Por encima de este intervalo puede resultar tóxico y por debajo del mismo, inefectivo. El suministro tradicional de fármacos (línea continua negra de la figura 1) lleva asociado un pico en la concentración del fármaco en el cuerpo, en el que se supera el valor umbral de toxicidad, para después decaer rápidamente hasta valores de ineffectividad. La liberación controlada de fármacos trata de conseguir un aporte constante del fármaco evitando así picos de concentración.⁹ Esto se consigue mediante sistemas que lo liberan de forma paulatina para lograr una concentración terapéuticamente activa del fármaco libre que sea estable en el tiempo (línea continua gris).

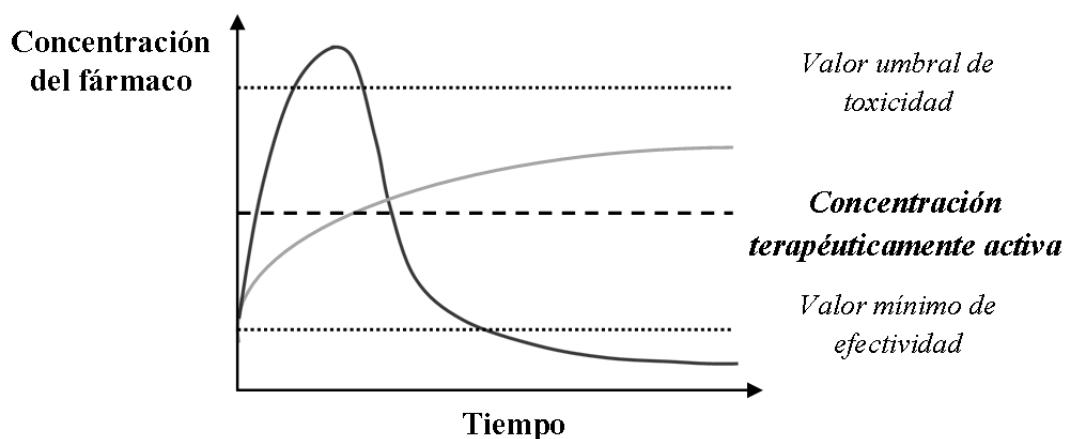


Fig. 1. Perfil de exposición del cuerpo humano a un fármaco con suministro tradicional (línea negra) o con sistemas de liberación controlada de fármacos (línea gris).

⁹ Luo, Y., Prestwich, G. *Expert Opin. Ther. Patents*, **2001**, *11*, 1395-1410.

Se puede disminuir todavía más el riesgo de efectos secundarios si, además de evitar los picos de concentración, se consigue una liberación localizada en el tejido dañado (figura 2). Esto se puede conseguir mediante sistemas que encapsulen el fármaco y lo liberen una vez alcanzado el objetivo en respuesta a algún estímulo externo como el pH, la temperatura o la radiación electromagnética.¹⁰ Para guiar el fármaco al tejido dañado se pueden utilizar transportadores funcionalizados con ligandos específicos que interaccionan con los receptores del tejido diana de forma selectiva (figura 2.c).^{11, 12}

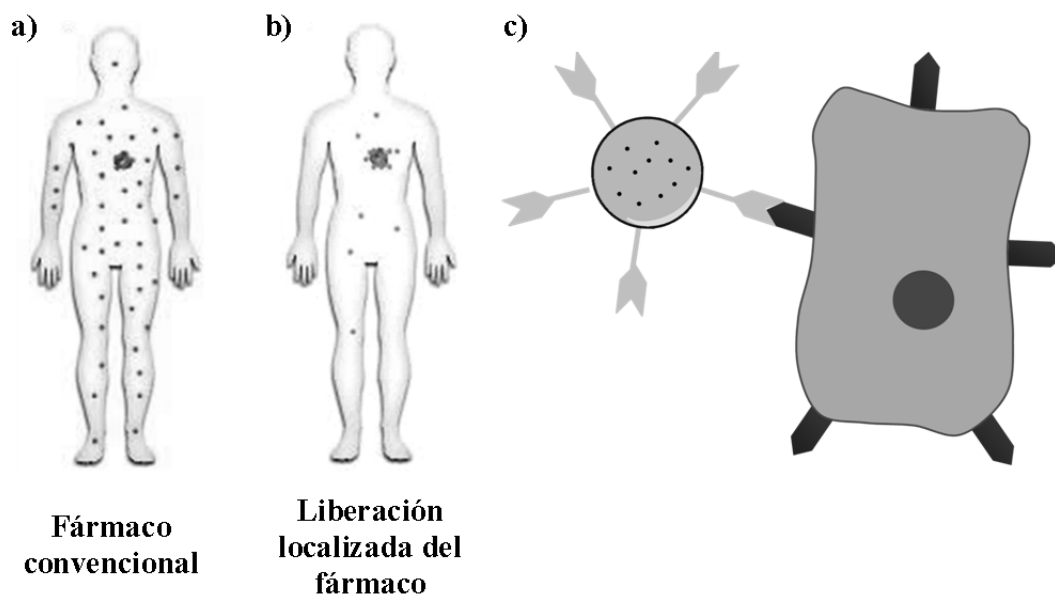


Fig. 2. Distribución por el organismo de un fármaco tradicional (a) y de un sistema de liberación localizada de fármacos (b). Interacción del transportador del fármaco con la célula diana mediante ligandos específicos (c).

Los biomateriales empleados en aplicaciones de liberación controlada de fármacos no han de provocar respuesta inflamatoria en el organismo. Además, es

¹⁰ Bajpai, A.K., Shukla, S.K., Bhanu, S., Kankane, S. *Prog. Polym. Sci.*, **2008**, *33*, 1088-1118.

¹¹ Jaracz, S., Chen, J., Kuznetsova, L.V., Ojima, I. *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, *13*, 5043-5054.

¹² Park, T.G., Jeong, J.H., Kim, S.W. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2006**, *58*, 467-486.

recomendable que sean biodegradables ya que así pueden ser metabolizados y eliminados por el organismo. Esto disminuye el riesgo de que estos materiales se acumulen y puedan generar algún tipo de respuesta inflamatoria. El tiempo que debe tardar en liberarse el fármaco depende de la aplicación y puede variar desde unos pocos minutos como en la liberación de fármacos destinados a enfermedades pulmonares¹³ a varios meses como en la liberación de sistemas anticonceptivos.¹⁴ Este proceso de liberación puede estar controlado por la difusión del compuesto fuera del material que lo transporta, o por la degradación del material en el que el fármaco está encapsulado. El primer caso es típico de los hidrogeles, en los que el compuesto se halla en el interior del material y la absorción de agua por parte del mismo hace que el fármaco pueda liberarse al exterior por simple difusión. En dicho proceso de liberación intervienen una gran cantidad de factores que hacen que la difusión sea más o menos rápida¹⁵ por lo que el proceso de liberación de la carga es difícil de controlar. En sistemas tipo vesículas en los que la carga no puede difundir al exterior, la liberación puede estar controlada por la degradación del material. Esto permite conseguir un perfil de liberación más constante¹⁶ que además se puede modificar controlando el perfil de degradación, el cual se puede optimizar mediante un buen diseño químico del material.¹⁷

1.1.1.2. Ingeniería de Tejidos

La escasez de órganos para trasplantes, así como la posibilidad de un rechazo por parte del organismo huésped al incorporar un órgano ajeno han provocado un gran interés en el desarrollo de la Ingeniería de Tejidos. Esta disciplina intenta regenerar

¹³ Cook, R.O., Pannu, R.K., Kellaway, I. *J. Control. Release*, **2005**, *104*, 79-90.

¹⁴ Dhanaraji, M.D., Vema, K., Jayakumar, R., Vamsadhara, C. *Int. J. Pharm.*, **2003**, *268*, 23-29.

¹⁵ Maderuelo, C., Zarzuelo, A., Lanao, J.M. *J. Control. Release*, **2011**, *154*, 2-19.

¹⁶ Huang, X., Brazel, C. *J. Control. Release*, **2001**, *73*, 121-136.

¹⁷ Göpferich, A. *Biomaterials*, **1996**, *17*, 103-114.

tejidos a su estado funcional a partir de células aisladas del propio paciente, evitando así el rechazo inmune por parte del organismo. Para ello las células se cultivan sobre un andamiaje o *scaffold* que guía el crecimiento celular hasta obtener un tejido funcional. Este proceso regenerativo puede tener lugar *in vitro* para después ser implantado, o *in vivo* si la regeneración se produce dentro del organismo tras implantar el andamiaje con las células (figura 3).

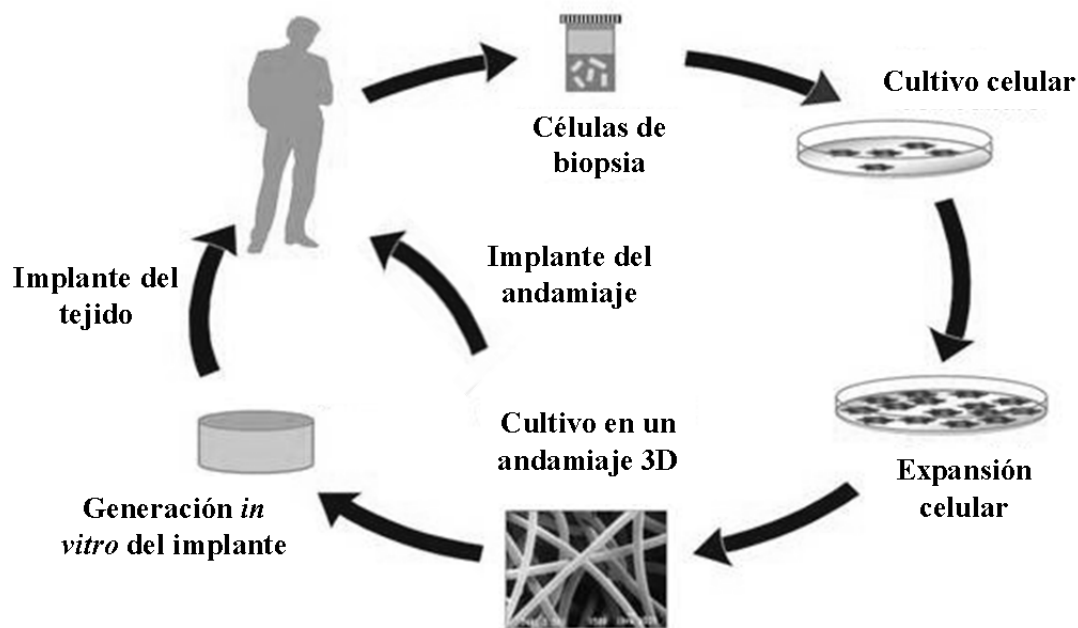


Fig. 3. Esquema del proceso de regeneración de un tejido implantable mediante Ingeniería de Tejidos.

La regeneración de un tejido implica llegar a tener las mismas células que componen ese tejido en un entorno análogo al del tejido original. Esto hace deseable una degradación del material a medida que las células proliferan y sintetizan los componentes de la matriz extracelular (*Extra Cellular Matrix* - ECM), que es el entorno natural de las células. Dicho proceso de degradación ha de ser suficientemente rápido para poder ser sustituido por el tejido en desarrollo, pero a la vez suficientemente lento

para que el andamiaje mantenga la consistencia mecánica necesaria para soportar el crecimiento celular hasta que se sintetice la nueva ECM.

Además, la obtención de un tejido funcional requiere que el crecimiento celular esté guiado para que la disposición y morfología final de las células en la nueva ECM sintetizada durante la regeneración del tejido (que ha sustituido al andamiaje biodegradable) sea análoga a la del tejido vivo original antes de ser dañado. Para conseguir esto se emplea un andamiaje que trata de mimetizar al entorno natural ya que, en tal caso, las células cultivadas sobre él se comportan de forma análoga a como lo harían en un proceso regenerativo natural. Para ello se han de tener en cuenta diversos factores en la preparación del andamiaje como son la composición química,^{18, 19} las propiedades mecánicas del material^{18, 20, 21} o la estructura,^{18, 19, 20, 22} que pueden condicionar notablemente el crecimiento celular y deben ser optimizados para cada tipo de tejido. Además de factores físico-químicos como los citados anteriormente, la presencia de biomoléculas que proporcionen señales biológicas puede inducir procesos como la proliferación o la diferenciación celular y favorecer, por tanto, la obtención de un tejido maduro funcional.^{23, 24}

1.1.2. POLÍMEROS COMO BIOMATERIALES

Entre los materiales aplicados en Medicina, los polímeros están siendo ampliamente investigados dada su versatilidad sintética y su facilidad de procesado que

¹⁸ Yang, S., Leong, K.F., Du, Z., Chua, C.K. *Tissue Eng.*, **2001**, *7*, 679-689.

¹⁹ Scharnagl, N., Lee, S., Hiebl, B., Sisson, A., Lendlein, A. *J. Mater. Chem.*, **2010**, *20*, 8789-8802.

²⁰ Stella, J.A., D'Amore, A., Wagner, W.R., Sacks, M.S. *Acta Biomater.*, **2010**, *6*, 2365-2381.

²¹ Hervy, M. *J. Adh. Sci. Technol.*, **2010**, *24*, 963-973.

²² Biggs, M.J.P., Richards, R.G., Dalby, M.J. *Nanomedicine*, **2010**, *6*, 619-633.

²³ Bacáková, L., Filová, E., Rypáček, F., Svorcik, V., Starý, V. *Physiol. Res.*, **2004**, *53*, 35-45.

²⁴ Shoichet, M.S. *Macromolecules*, **2010**, *43*, 581-591.

permiten generar materiales en los que se puede controlar tanto las propiedades físico-químicas^{25, 26} como la estructura^{27, 28} o la velocidad de degradación.^{29, 30}

Los polímeros se pueden clasificar, atendiendo a su origen, en naturales o sintéticos. Atendiendo a su degradabilidad en condiciones fisiológicas, pueden clasificarse en biodegradables o bioestables. A continuación se hará una breve revisión de algunos de los polímeros sintéticos (tanto bioestables como biodegradables) y naturales más relevantes empleados como biomateriales.

1.1.2.1. Polímeros sintéticos

La gran variedad de monómeros y aproximaciones sintéticas disponibles permiten acceder a una amplia variedad de materiales cuyas propiedades pueden ser moduladas ya desde la misma síntesis. Esto permite obtener polímeros biocompatibles que se pueden modificar químicamente para optimizar sus propiedades y poder así cumplir de la mejor forma posible la función para la que son diseñados. Según la capacidad de degradación en el entorno biológico podemos clasificarlos en bioestables y biodegradables.

²⁵ Drotleff, S., Lungwitz, U., Breunig, M., Dennis, A., Blunk, T., Tessmar, J., Göpferich, A. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2004**, *58*, 385-407.

²⁶ Grodzinski, J.J. *Polym. Adv. Technol.*, **2006**, *17*, 395-418.

²⁷ Widmer, M.S., Mikos, A.G. Fabrication of Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering. Patrick, C.W., Mikos, A.G., McIntire, L.V. Editors, *Frontiers in Tissue Engineering*. Elsevier, **1998**. p. 107-120.

²⁸ Seunarine, K., Gadegaard, N., Tormen, M., Meredith, D.O., Riehle, M.O., Wilkinson, C.D.W. *Nanomedicine*, **2006**, *1*, 261-296.

²⁹ Gomes, M.E., Reis, R.L. *Int. Mater. Rev.*, **2004**, *49*, 261-273.

³⁰ Lyu, S.P., Untereker, D. *Int. J. Mol. Sci.*, **2009**, *10*, 4033-4065.

BIOESTABLES

Los polímeros bioestables son aquellos que no se degradan en condiciones fisiológicas por lo que se utilizan en aplicaciones a largo plazo en las que el material polimérico ha de conservar sus propiedades con el paso del tiempo. Estos polímeros se pueden utilizar para la fabricación de implantes. Así el UHMWPE se utiliza en la fabricación de acetábulos, o los poliuretanos que se utilizan para la fabricación de válvulas cardíacas y tubos sanguíneos, tal y como se ha comentado anteriormente. Dentro de esta última aplicación cabe mencionar también el polidimetilsiloxano y el poli(tereftalato de etileno).³¹ Otros polímeros bioestables con aplicaciones en Medicina son aquellos basados en compuestos acrílicos. Estos materiales se han utilizado tanto en la fabricación de hidrogeles para lentes de contacto^{32, 33} como en la preparación de cementos para implantes óseos⁷ y piezas dentales.³⁴

BIODEGRADABLES

Los polímeros biodegradables (en el ámbito de la Medicina Regenerativa) son aquellos que, en condiciones fisiológicas, sufren degradación de la cadena polimérica. Estos polímeros son muy interesantes en aplicaciones como la liberación controlada de fármacos o la Ingeniería de Tejidos, donde el biomaterial ha de mantener su funcionalidad durante un periodo de tiempo determinado. Además, la degradación del polímero supone una estrategia para eliminar el material del organismo, lo que evita tener que intervenir al paciente quirúrgicamente para ser retirados.

³¹ Venkatraman, S., Boey, F., Lao, L.L. *Prog. Polym. Sci.*, **2008**, *33*, 853-874.

³² Kopecek, J. *J. Polym. Sci. A*, **2009**, *47*, 5929-5946.

³³ Lloyd, A.W., Faragher, R.G.A., Denyer, S.P. *Biomaterials*, **2001**, *22*, 769-785.

³⁴ Cramer, N.B., Stansbury, J.W., Bowman, C.N. *J. Dent. Res.*, **2011**, *90*, 402-416.

Durante el proceso de degradación, el biomaterial está en constante cambio y las cadenas poliméricas, o los productos resultantes de la degradación, podrían generar una respuesta adversa o no deseada en el organismo. Por lo tanto, al diseñar un material biodegradable han de tenerse en cuenta no solo las propiedades del material sino también ciertos factores como la biocompatibilidad de los productos generados en la degradación, o que el material tenga unas propiedades adecuadas para mantener la bioactividad y no cause respuesta inflamatoria durante todo el proceso de degradación.

Muchos de estos polímeros biodegradables están basados en enlaces éster, amida o anhídrido que se pueden hidrolizar en medio fisiológico.^{35, 36} Otros polímeros, como algunos poliéteres, pueden ser degradados por enzimas del cuerpo humano dando lugar a fragmentos más cortos que pueden ser expulsados por el sistema excretor.

Dentro de la familia de los polímeros de degradación enzimática, uno de los más empleados es el polietilenglicol (PEG). Su naturaleza hidrófila hace que, debido a la interacción del agua con las cadenas poliméricas, se rodee de una capa de disolvente que previene la absorción de proteínas así como del reconocimiento por parte de células inmunes como los macrófagos. Debido a estas propiedades, el PEG es muy utilizado para aumentar la biocompatibilidad de dispositivos biomédicos como nanopartículas para diagnóstico médico o hipertermia, o para generar vesículas biocompatibles para el transporte de fármacos.³⁷ En Ingeniería de Tejidos se utiliza también para formar andamiajes biocompatibles en los que a menudo se combina con otros polímeros hidrolíticamente biodegradables, como los poliésteres alifáticos, para poder modular algunas propiedades del material como las propiedades mecánicas, la hidrofilia, la

³⁵ Ulery, B.D., Nair, L.S., Laurencin, C.T. *J. Polym. Sci. B*, **2011**, 49, 832-864.

³⁶ Nair, L.S., Laurencin, C.T. *Prog. Polym. Sci.*, **2007**, 32, 762-798.

³⁷ Grodzinski, J.J. *Polym. Adv. Technol.*, **2009**, 20, 595-606.

velocidad de degradación, o la adhesión celular.³⁸ El PEG también se puede combinar con polímeros naturales para dotar al andamiaje de cierta bioactividad.³⁹

Entre los polímeros hidrolíticamente degradables, los polihidroxicanoatos (con enlaces éster hidrolizables) son una de las familias de polímeros con mayor aplicación en Biomedicina. La capacidad para modular sus propiedades físicas, junto con su facilidad de procesado, han hecho que estos materiales sean muy útiles en la fabricación de andamiajes para Ingeniería de Tejidos.^{40, 41} Por ejemplo, han sido ampliamente estudiados en aplicaciones para regeneración de tejido óseo y cartilaginoso,⁴² donde es común encontrarlos formando composites con materiales inorgánicos para mimetizar mejor la composición de estos tejidos.⁴³ También son muy utilizados para la fabricación de suturas quirúrgicas,⁴⁰ especialmente los copolímeros de ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PGA) de los que existen diversos productos comerciales como el Vicryl® o el Dexon®.

Otros polímeros basados en enlaces hidrolíticamente lábiles como los poliacetales o polianhidridos tienen aplicación en liberación controlada de fármacos. En este caso, sus pobres propiedades mecánicas no los hacen apropiados para aplicación en Ingeniería de Tejidos.^{35, 36} Los policarbonatos y poliamidas también son estudiados para liberación controlada pero, debido a su resistencia a la hidrólisis, suelen encontrarse combinados con otros polímeros para aumentar la velocidad de degradación del material.^{35, 36} Los polímeros basados en fósforo, como los polifosfoésteres o polifosfacenos, dan compuestos con propiedades reguladoras del pH al degradarse. Esta propiedad los hace interesantes para combinarlos con los polihidroxicanoatos ya que

³⁸ Claper, J.D., Skeie, J.M., Mullins, R.F., Guymon, C.A. *Polymer*, **2007**, *48*, 6554-6564.

³⁹ Zhu, J. *Biomaterials*, **2010**, *31*, 4639-4656.

⁴⁰ Ueda, H., Tabata, Y. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2003**, *55*, 501-518.

⁴¹ Serrano, M.C., Chung, E.J., Ameer, G.A. *Adv. Funct. Mater.*, **2010**, *20*, 192-208.

⁴² Hutmacher, D.W. *Biomaterials*, **2000**, *21*, 2529-2543.

⁴³ Rezwan, K., Chen, Q.Z., Blaker, J.J., Boccaccini, A.R. *Biomaterials*, **2006**, *27*, 3413-3431.

éstos, al degradarse, generan hidroxiácidos que pueden provocar una cierta acidez local y pueden inducir respuesta inflamatoria en el tejido colindante. Los polifosfacenos también han mostrado utilidad para fabricar recubrimientos de agujas metálicas en los que se puede encapsular vacunas.⁴⁴

En la tabla 1 se recogen la estructura química y el campo de aplicación en Biomedicina de algunas de las familias de polímeros sintéticos biodegradables más importantes en Medicina, así como sus principales ventajas y desventajas en su utilización como biomateriales. Los grupos R situados en la cadena polimérica suelen ser cadenas alifáticas debido a su menor toxicidad respecto a los compuestos aromáticos. En los grupos R laterales puede haber distintos grupos funcionales que pueden proporcionar al material ciertas propiedades o permitir la funcionalización del mismo por ejemplo con moléculas bioactivas.

⁴⁴ Adrianov, A.K., DeColibus, D.P., Gillis, H.A., Kha, H.H., Marin, A., Prausnitz, M.R., Babiuk, L.A., Townsend, H., Mutwin, G. *PNAS*, **2009**, *106*, 18936-18941.

Tabla 1. Aplicaciones, ventajas, desventajas y ejemplos de los diferentes grupos de polímeros sintéticos biodegradables.

Polímeros	Aplicaciones ¹	Ventajas	Desventajas	Estructura ²
Poli-hidroxicanoatos	IT, LCF	Procesabilidad, propiedades mecánicas y perfil de degradación controlables, síntesis sencilla	Productos de degradación ácidos	$\left[\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O} \right]_n$
Poliacetales	LCF	Degradación en productos neutros, degradación sensible al pH	Bajos pesos moleculares, síntesis compleja	$\left[\text{R}_1-\text{O}-\overset{\text{R}_2}{\underset{\text{R}_3}{\text{C}}}-\text{O} \right]_n$
Polianhidridos	IT, LCF	Flexibilidad sintética, perfil de degradación controlable	Bajo peso molecular, malas propiedades mecánicas	$\left[\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O} \right]_n$
Policarbonatos	IT, LCF, FI	Propiedades mecánicas controlables, degradación superficial	Degradación limitada (requiere copolimerización con otros polímeros)	$\left[\text{R}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O} \right]_n$
Poliamidas	LCF	Grupos funcionalizables, productos de degradación altamente biocompatibles	Degradación muy limitada, la presencia de cargas (a pH ácido) induce toxicidad	$\left[\text{R}-\overset{\text{H}}{\underset{\text{O}}{\parallel}{\text{N}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_n$
Poli(orto ésteres)	LCF	Perfil de degradación controlable, degradación sensible al pH	Malas propiedades mecánicas, síntesis compleja	$\left[\text{R}_1-\text{O}-\overset{\text{R}_2}{\underset{\text{O}-\text{R}_3}{\text{C}}}-\text{O} \right]_n$
Polifosfoésteres	IT, LCF	Compatibilidad con biomoléculas, productos de degradación altamente biocompatibles	Síntesis compleja	$\left[\text{R}_1-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{P}}-\text{O} \right]_n$ R_2
Polifosfacenos	IT, EV	Flexibilidad sintética, propiedades mecánicas controlables	Síntesis compleja	$\left[\overset{\text{R}_1}{\underset{\text{R}_2}{\text{P}}}=\text{N} \right]_n$

¹ Aplicaciones: IT (Ingeniería de Tejidos), LCF (liberación controlada de fármacos), EV (encapsulación de vacunas), FI (fijación de implantes).

² El grupo R es normalmente una cadena alifática.

1.1.2.2. Polímeros naturales

Los polímeros naturales son macromoléculas sintetizadas por organismos de origen vegetal o animal entre los que podemos encontrar polímeros muy diversos como el caucho natural, los ácidos nucleicos, los polisacáridos o las proteínas. De todos ellos, las proteínas de la ECM y los polisacáridos son los más utilizados como biomateriales debido a su estructura química única, que está ligada a su función biológica dentro del organismo, y que hace que muestren una gran bioactividad cuando son utilizados como biomateriales.^{45, 46} Su aplicación se extiende a diversos campos como la liberación controlada de fármacos,^{47, 48} la Ingeniería de Tejidos,^{49, 50} el recubrimiento de dispositivos para diagnóstico médico,³ o la fabricación de suturas.⁴ Su principal limitación es que ofrecen una baja versatilidad sintética por lo que a menudo se combinan con polímeros sintéticos para obtener materiales bioactivos en los que se pueden modular las propiedades de manera precisa.⁵¹

PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS

Estos compuestos son poliamidas que tienen diversas funciones en el organismo, una de las cuales es su función estructural. Esta función la desempeñan principalmente las proteínas de la ECM, que conforman el entorno natural de las células en los tejidos vivos. Entre las proteínas de la ECM cabe destacar el colágeno que es la más abundante tanto en la piel como en tejidos musculoesqueléticos por lo que se utiliza ampliamente

⁴⁵ Dutta, R.C., Dutta, A.K. *Biotechnol. Adv.*, **2010**, 28, 764-769.

⁴⁶ Friedl, P., Zänker, K.S., Bröcker, E.B. *Microsc. Res. Tech.*, **1998**, 43, 369-378.

⁴⁷ Malafaya, P.B., Silva, G.A., Reis, R.L. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2007**, 59, 207-233.

⁴⁸ Dang, J.M., Leong, K.W. *Adv. Drug Deliv.*, **2006**, 58, 487-499.

⁴⁹ Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., Schacht, E. *Biomacromolecules*, **2011**, 12, 1387-1408.

⁵⁰ Badylak, S.F., Freytes, D.O., Gilbert, T.W. *Acta Biomater.*, **2009**, 5, 1-13.

⁵¹ Sionkowska, A. *Prog. Polym. Sci.*, **2011**, 36, 1254-1276.

en suturas biodegradables⁵² ya que ayuda a regenerar tanto tejidos musculares como la piel o el tejido vascular. También son estudiadas como materiales para la fabricación de andamiajes destinados a la regeneración de tejido óseo, en donde se combinan con diversos compuestos inorgánicos como fosfato de calcio o hidroxiapatito.⁵³ De esta forma se consigue mimetizar muy bien la composición química del hueso, formado principalmente por colágeno y fosfato de calcio. Otras proteínas como la fibrina y la elastina son polímeros reticulados de fibras de fibrinógeno y de tropoelastina respectivamente. Debido a su estructura química tienen propiedades elásticas por lo que se utilizan en suturas quirúrgicas para la regeneración de tejidos musculares.⁵⁴

Es notable también el uso de péptidos sintéticos de cadena corta, que son secuencias peptídicas que tratan de imitar la bioactividad de las proteínas naturales a la vez que ofrecen una mayor versatilidad sintética. Se sabe que las proteínas basan su bioactividad en la secuencia química de varios dominios específicos. Uno de los casos más conocidos es la secuencia RGD (Arginina-Glicina-Ácido aspártico) que promueve la adhesión celular.⁵⁵ Este conocimiento se ha aprovechado para sintetizar polipéptidos de cadena corta con la secuencia específica de interés, de forma que pueden incorporarse a los polímeros sintéticos para dotarlos de la bioactividad propia de las proteínas naturales.⁵⁶

⁵² Ruszczak, Z. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2003**, 55, 1595-1611.

⁵³ Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T. *Macromol. Biosci.*, **2002**, 2, 67-77.

⁵⁴ Mana, M., Cole, M. Cox, S., Tawil, B. *Wound Rep. Reg.*, **2006**, 14, 72-80.

⁵⁵ Bellis, S.L. *Biomaterials*, **2011**, 32, 4205-4210.

⁵⁶ Hersel, U., Dahmen, C., Kessler, H. *Biomaterials*, **2003**, 24, 4385-4415.

POLISACÁRIDOS

Los polisacáridos son polímeros basados en la repetición de monosacáridos unidos por enlaces glicosídicos para dar lugar a compuestos poliméricos. Algunos de estos polímeros, como el sulfato de condroitina, el quitosano o el ácido hialurónico (figura 4) también tienen aplicación en diversos campos de la Biomedicina como el de las suturas quirúrgicas,⁵⁷ la Ingeniería de Tejidos⁴⁷ o la liberación controlada de fármacos.⁵⁸ Así, el sulfato de condroitina (figura 4.a) es un compuesto muy común en el tejido cartilaginoso y, debido a ello, muestra una gran bioactividad en el cultivo de condrocitos⁵⁹ que son las células presentes en el tejido cartilaginoso. Esto hace que se haya utilizado ampliamente para la fabricación de andamiajes para regeneración de este tipo de tejido.^{60, 61} El quitosano (figura 4.b) ha sido ampliamente investigado en aplicaciones de liberación controlada de fármacos ya que los grupos amino de la cadena polimérica hacen posible su funcionalización con ligandos específicos,⁶² le pueden conferir cierta carga positiva que lo convierte en un buen agente de internalización para terapia génica,⁶³ y permiten fabricar dispositivos sensibles al pH⁶² útiles en liberación localizada de fármacos. El ácido hialurónico y sus sales derivadas (figura 4.c), debido a su interacción con las células tumorales,⁶⁴ es un material muy útil para la liberación localizada de fármacos anticancerígenos como el paclitaxel⁶⁵ o la doxorubicina.⁶⁶

⁵⁷ Kirker, K.R., Luo, Y., Nielson, J.H., Shelby, J., Prestwich, G.D. *Biomaterials*, **2002**, 23, 3661-3671.

⁵⁸ Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C., Zhang, Z. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2008**, 60, 1650-1662.

⁵⁹ Van Susante, J.L.C., Pieper, J., Buma, P., Van Kuppevelt, T.H., Van Beuningen, H., Van der Kraan, P.M., Veerkamp, J.H., Van den Berg, W.B., Veth, R.P.H. *Biomaterials*, **2001**, 22, 2359-2369.

⁶⁰ Ko, C.S., Huang, J.P., Huang, C.W., Chu, I.M. *J. Biosci. Bioeng.*, **2009**, 107, 177-182.

⁶¹ Chang, K.Y., Cheng, L.W., Ho, G.H., Huang, Y.P., Lee, Y.D. *Acta Biomater.*, **2009**, 5, 1937-1947.

⁶² Park, J.H., Saravanakumar, G., Kim, K., Kwon, I.C. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2010**, 62, 28-41.

⁶³ Saranya, N., Moorthi, A., Saravanan, S., Devi, M.P., Selvamurugan, N. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2011**, 48, 234-238.

⁶⁴ Toole, B.P. *Nat. Rev.*, **2004**, 4, 528-539.

⁶⁵ Banzato, A., Rondina, M., Meléndez-Alafort, L., Zangoni, E., Nadali, A., Renier, D., Moschini, G., Mazzi, U., Zanovello, P., Rosato, A. *Nuc. Med. Bio.*, **2009**, 36, 525-533.

⁶⁶ Upadhyay, K.K., Bhatt, A.N., Mishra, A.K., Dwarakanath, B.S., Jain, S., Schatz, C., Le Meins, J.F., Farooque, A., Chandraiah, G., Jain, A.K., Misra, A., Lecommandoux, S. *Biomaterials*, **2010**, 31, 2882-2892.

Además, el ácido hialurónico está presente en la ECM de muchos tejidos del cuerpo humano (especialmente en los tejidos blandos conectivos) y puede promover diversos procesos biológicos como la proliferación celular, la segregación de nueva ECM o la expresión de genes.^{67, 68, 69} Esto hace que este polisacárido también sea un precursor muy interesante para la fabricación de suturas y andamiajes para regeneración de tejidos.

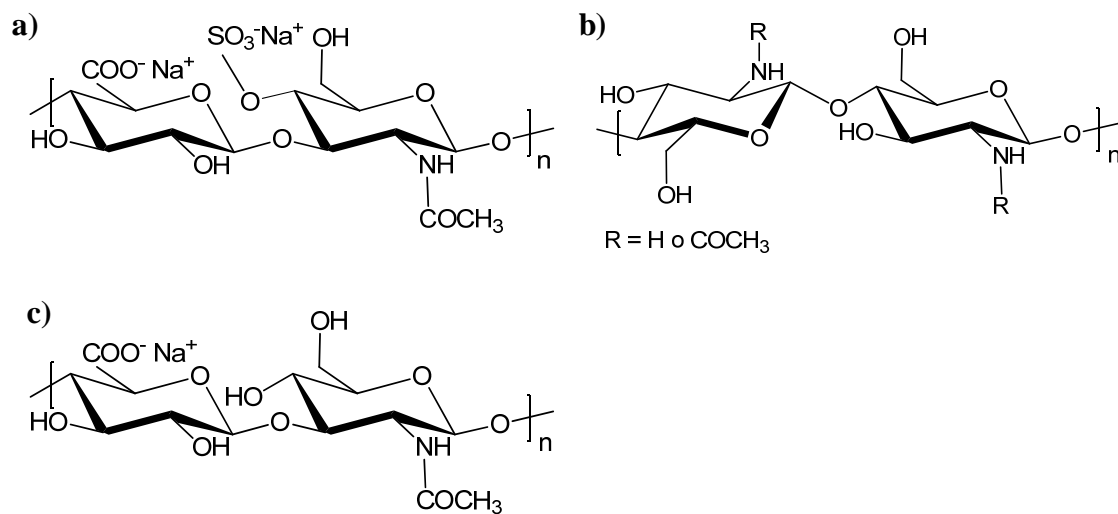


Fig. 4. Estructura química del sulfato de condroitina (a), del quitosano (b) y del hialuronato de sodio (c).

⁶⁷ West, D.C., Hampson, I.N., Arnold, F., Kumar, S. *Science*, **1985**, 228, 1324-1326.

⁶⁸ Chen, W.Y. Abatangelo, G. *Wound Repair Reg.* **1999**, 7, 79-89.

⁶⁹ Toole, B.P. *Cell Dev. Biol.* **2001**, 12, 79-87.

1.2. FOTOPOLIMERIZACIÓN Y ESTRUCTURACIÓN CON LUZ

Entre los diversos métodos de preparación de polímeros sintéticos, la fotopolimerización ocupa un lugar destacado al emplear un estímulo externo como la luz para desencadenar y controlar el proceso de polimerización, lo que abre la posibilidad de estructurar el material. Tanto la fotopolimerización como la estructuración con luz de materiales poliméricos juegan un papel importante en el campo de los biomateriales. Antes de revisar tales aplicaciones, en este apartado se repasarán aspectos generales y básicos de fotopolimerización y estructuración con luz.

1.2.1. REACCIONES DE FOTOPOLIMERIZACIÓN

Se conoce como fotopolimerización a la reacción en la que se utiliza la luz para formar una estructura polimérica.^{70, 71} En el caso de usar monómeros multifuncionales con varios grupos reactivos, o bien oligómeros o polímeros con varios grupos reactivos (macromonómeros), se obtiene una red polimérica entrecruzada. Este proceso presenta algunas ventajas respecto a la polimerización térmica como son rapidez, bajo consumo de energía y la posibilidad de llevar a cabo la reacción a temperatura controlada. Además, al estar inducido por un estímulo externo como es la luz, permite un control espacio-temporal del proceso ya que se puede elegir dónde y cuándo irradiar para iniciar la reacción. Debido a todas estas ventajas, este tipo de reacciones se han utilizado en diversas aplicaciones como la fabricación de recubrimientos o de dispositivos

⁷⁰ Odian, G. *Principles of Polymerization*, Wiley-Interscience, 3ª ed., New York, EEUU, 1991, p.198-289.

⁷¹ Fouassier, J.P. *Photoinitiation, Photopolymerization And Photocuring*, Hanser Gardner Publications, 1995, p.145-237.

electrónicos mediante fotolitografía. Estas reacciones también se utilizan para la fabricación de implantes dentales, lentes de contacto y otros dispositivos en aplicaciones médicas. A continuación se va a revisar muy brevemente el proceso de fotopolimerización en cadena, que es el más utilizado en el campo de los fotopolímeros, para posteriormente repasar otros procesos de fotopolimerización menos frecuentes pero relacionados con este trabajo como son la fotopolimerización por reacción de enlaces múltiples con tioles (tiol-enos y tiol-inos) y la fotopolimerización por descomposición de sales de diazonio.

La fotopolimerización en cadena es un tipo de polimerización en el cual, a través de un proceso fotoinducido, se genera una especie radicalaria o iónica (a partir de un iniciador) que por reacción con el grupo reactivo del monómero o macromonómero genera una cadena polimérica activada en un extremo. Este extremo activo se transfiere de una unidad monomérica a otra conforme éstas se van incorporando a la cadena en crecimiento (propagación de la cadena). Esta especie reactiva puede ser por ejemplo un catión orgánico como en la polimerización de epóxidos y viniléteres. No obstante, el más común es el proceso de fotopolimerización en cadena radicalaria de compuestos con dobles enlaces, entre los que destacan los derivados acrílicos.

Si nos centramos en la fotopolimerización en cadena radicalaria, el mecanismo consta de tres etapas básicas: iniciación, propagación y terminación. En la primera etapa se forma un radical libre por escisión homolítica de un enlace por vía fotoquímica. Esto requiere, en general, de una molécula fotosensible (fotoiniciador) que genere radicales libres por acción de la luz.⁷² A continuación este radical se adiciona a un monómero para generar la cadena polimérica reactiva (figura 5). En la etapa de propagación o de

⁷² Hageman HJ. Photoinitiators and Photoinitiation Mechanisms of Free-Radical Polymerization Processes. Finch, C.A., Allen, N.S. (Editor). *Photopolymerisation and Photoimaging Science and Technology*. Elsevier, Applied Science, London, New York, **1989**, p.1-53.

crecimiento de cadena, la cadena polimérica reactiva reacciona con más unidades monoméricas de tal forma que, tras la adición de cada monómero, en el extremo queda siempre un radical que puede seguir reaccionando (figura 5). En cada proceso de adición interviene una cadena polimérica reactiva y una molécula de monómero, por lo que la velocidad de este proceso estará controlada por la concentración de estas dos especies. En la etapa de terminación el radical de la cadena polimérica reacciona con otra especie distinta del monómero por combinación (unión de ambos radicales macromoleculares) o desproporción (transferencia de un hidrógeno de una cadena a otra), de forma que no se genera otro radical reactivo y la cadena deja de crecer. En la figura 5 se esquematizan estos dos procesos de terminación bimoleculares. La desactivación de cadenas en crecimiento puede producirse también por reacción con especies del entorno como disolvente, oxígeno o moléculas de fotoiniciador entre otras.

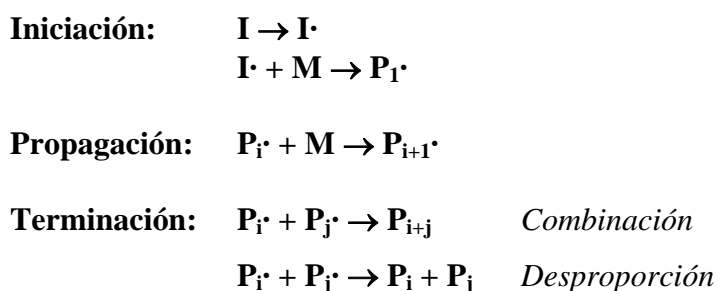


Fig. 5. Esquema básico de las etapas de iniciación, propagación y terminación en un proceso de fotopolimerización en cadena radicalaria.

1.2.1.1. Fotopolimerización de tiol-enos y tiol-inos

El proceso conocido como reacción de tiol-enos está basado en la adición de un grupo tiol a un doble enlace creando un enlace tioéter. Este proceso, que puede ser una adición tipo Michael a dobles enlaces deficientes en electrones o puede transcurrir por

un mecanismo radicalario fotoiniciado,^{73, 74} permite la formación de redes poliméricas si se utilizan moléculas con varios grupos tiol y varios grupos alqueno como los de la figura 6.

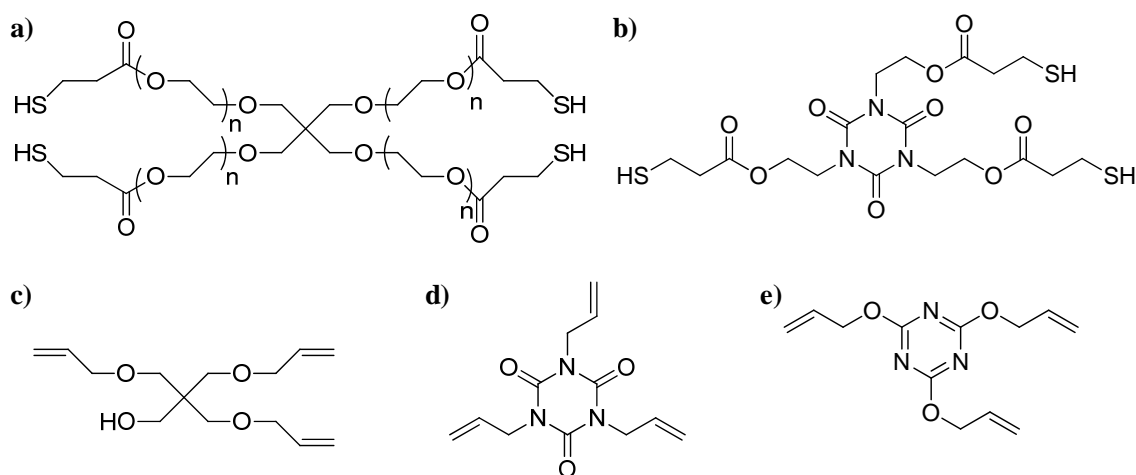


Fig. 6. Estructura química de tioles multifuncionales (a, b) y alquenos multifuncionales (c, d, e) utilizados en fotopolimerización por reacción de tiol-enos.

En el caso del proceso radicalario, los grupos tiol (en forma de radicales tiilo) pueden reaccionar también con triples enlaces formando un viniltioéter capaz de reaccionar con un segundo grupo tiol.⁷⁵ Este proceso fue aplicado por primera vez en la obtención de redes poliméricas con monómeros multifuncionales por Bowman y colaboradores.⁷⁶ Este proceso fue estudiado con el alquino difuncional 1,9-decadiino (DDY) y el tetratiol tetrakis(3-mercaptopropionato) de pentaeritritoílo (PETMP) representados en la figura 7.

⁷³ Hoyle, C.E., Bowman, C.N. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 1540-1573.

⁷⁴ Lowe, A.B. *Polym. Chem.*, **2010**, *1*, 17-36.

⁷⁵ Lowe, A.B., Hoyle, C.E., Bowman, C.N. *J. Mater. Chem.*, **2010**, *20*, 4745-4750.

⁷⁶ Fairbanks, B.D., Scott, T.F., Kloxin, C.J., Anseth, K.S., Bowman, C.N. *Macromolecules*, **2009**, *42*, 211-217.

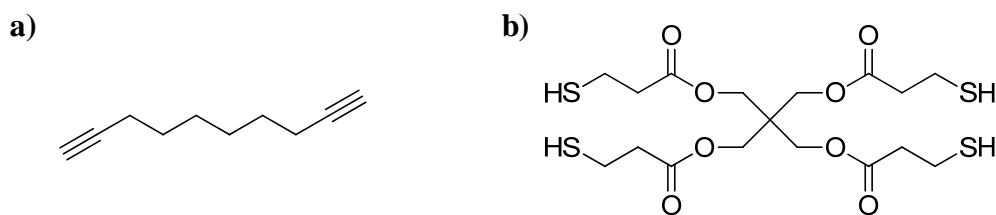


Fig. 7. Estructuras químicas del dialquino DDY (a) y del tiol multifuncional PETMP (b) utilizados en la formación de las primeras redes poliméricas por reacción de tiol-inos.⁷⁶

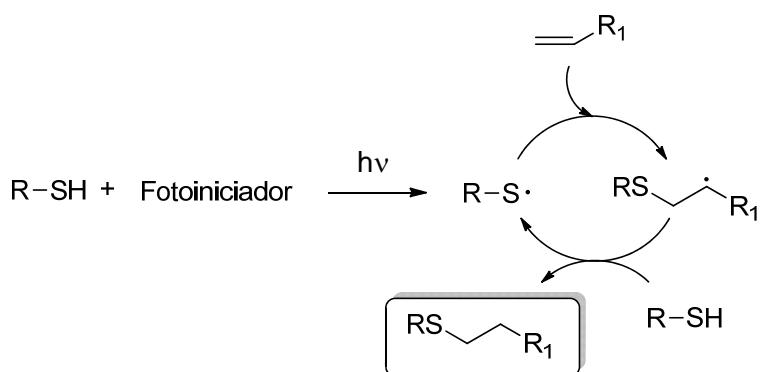
MECANISMO DE LA FOTOPOLIMERIZACIÓN DE TIOL-ENOS Y TIOL-INOS

La reacción fotoinducida de tiol-enos (sistema formado por tioles y compuestos con dobles enlaces) transcurre mediante un mecanismo radicalario (esquema 1) en el que se produce la rotura homolítica del enlace tiol. Esta rotura se lleva a cabo normalmente por acción de un radical que puede originarse a partir de la excitación con luz de un fotoiniciador. La rotura del enlace S-H también puede llevarse a cabo por irradiación directa con luz UV de longitud de onda alrededor de 250 nm de modo que no es estrictamente necesario el uso de un fotoiniciador para llevar a cabo esta reacción.⁷⁷

Una vez formado el radical tiilo ($-S\cdot$), el siguiente paso consiste en la adición a un doble enlace. Esta adición va a tener lugar siempre por el lado menos impedido estéricamente, quedando un radical secundario en el otro carbono del doble enlace. Este radical se transfiere a otro grupo tiol (transferencia de cadena) de forma que el átomo de hidrógeno del tiol se une al carbono del doble enlace a la vez que se genera un nuevo radical tiilo que continúa con la polimerización. El proceso de propagación consta por tanto de la adición del radical tiilo al doble enlace acoplado a la transferencia de cadena a otra molécula de tiol. Obviamente, para generarse una estructura polimérica se precisa

⁷⁷ Cramer, N.B., Scott, J.P., Bowman, C.N. *Macromolecules*, **2002**, 35, 5361-5365.

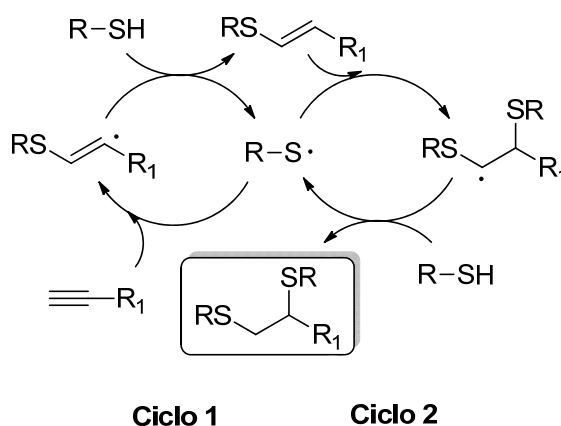
de un monómero con al menos dos grupos tioles y otro con al menos dos dobles enlaces. El proceso de terminación puede tener lugar indistintamente por recombinación de dos radicales tiolo, un radical tiolo con uno polimérico o dos radicales poliméricos.⁷⁸



Esquema 1. Mecanismo de la reacción radicalaria de tiol-enos.

La reacción de tiol-inos (esquema 2) transcurre por un mecanismo análogo⁷⁵ salvo porque en la primera adición de un tiol al triple enlace se genera un grupo viniléter. Este viniléter es capaz de reaccionar con un segundo tiol siendo, de hecho, más reactivo que el triple enlace inicial⁷⁶ e incluso más que un doble enlace sin conjugar.⁷⁷ El segundo grupo tiol, que reacciona con el viniléter formado en la primera adición de tiol, se adiciona regioselectivamente al otro átomo de carbono, quedando ambos grupos tiol en carbonos adyacentes.

⁷⁸ Khire, V.S., Harant, A.W., Watkins, A.W., Anseth, K.S., Bowman, C.N. *Macromolecules*, **2006**, *39*, 5081-5086.



Esquema 2. Mecanismo de la reacción radicalaria de tiol-inos.

CARACTERÍSTICAS DE LA FOTOPOLIMERIZACIÓN DE TIOL-ENOS Y TIOL- INOS

Las reacciones de tiol-enos y tiol-inos permiten la reticulación de monómeros multifuncionales o polímeros (macromonómeros) para obtener redes poliméricas (figura 8.b). Estas redes poliméricas se han descrito como más homogéneas que las obtenidas por fotopolimerización radicalaria de acrilatos (figura 8.a) ya que dan lugar a unas propiedades térmicas y mecánicas más definidas.⁷⁹ Además, el proceso de polimerización produce en general una contracción del material y la consiguiente aparición de una serie de tensiones mecánicas, no obstante éstas son menos marcadas en la fotopolimerización de dobles enlaces con tioles que en la fotopolimerización radicalaria de acrilatos.⁸⁰ Otra ventaja de la fotopolimerización por química de tiol-enos es que el grupo tiol es muy reactivo frente a la rotura homolítica, por lo que el proceso de transferencia del radical alifático al tiol es muy efectivo. Esto hace que el proceso de polimerización, a diferencia de la fotopolimerización en cadena de acrilatos, no se vea

⁷⁹ Senyurt, A.F., Wei, H., Hoyle, C.E., Piland, S.G., Gould, T.E. *Macromolecules*, **2007**, *40*, 4901-4909.

⁸⁰ Lee, T.Y., Carioscia, J., Smith, Z., Bowman, C.N. *Macromolecules*, **2007**, *40*, 1473-1479.

afectado por la presencia de oxígeno u otras impurezas que pudieran inactivar el proceso.⁷⁷

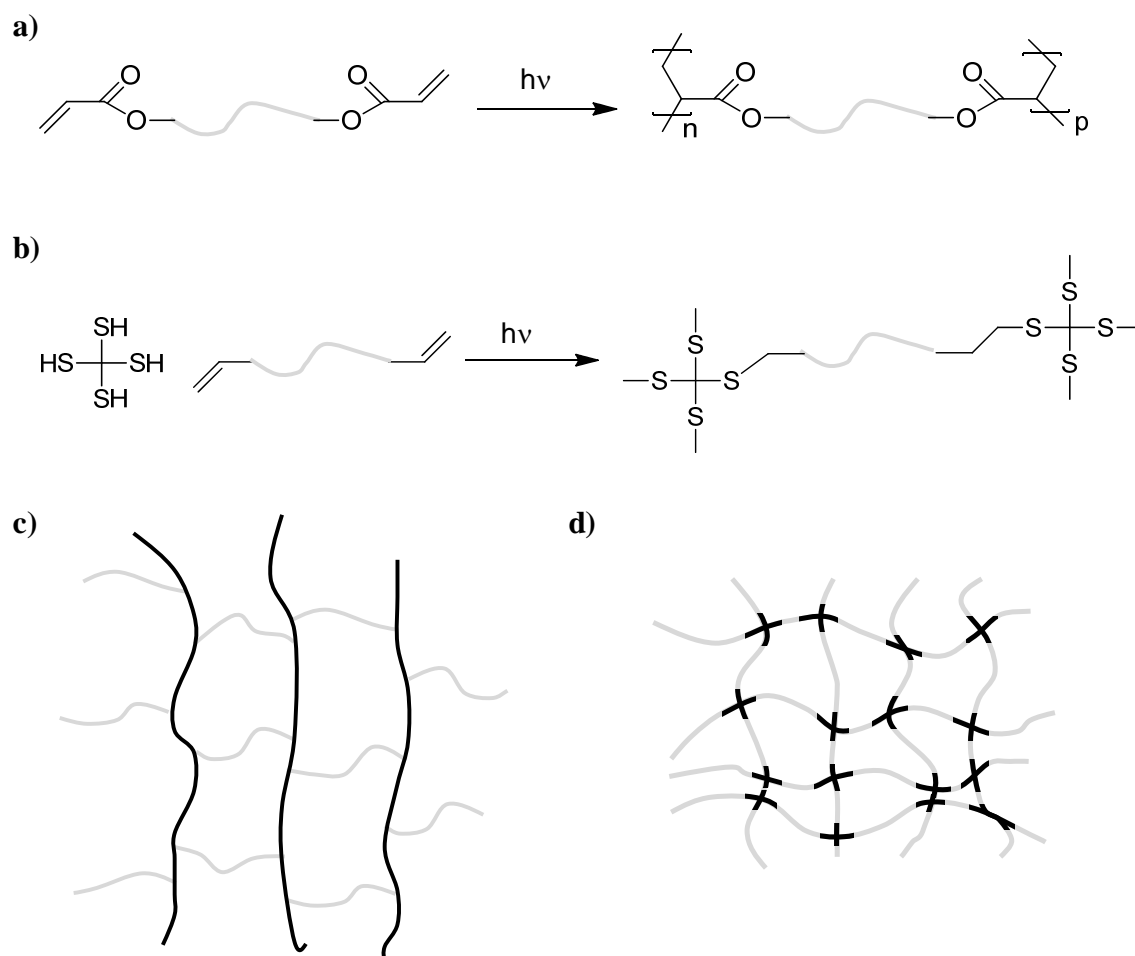


Fig. 8. Esquema de las reacciones de fotorreticulación de acrilatos difuncionales (a) y la estructura de la red obtenida (c). Esquema de la fotopolimerización de tiol-enos (b) y la estructura de la red obtenida (d). Las líneas negras representan las cadenas acrílicas o los grupos derivados del reticulante tiol, mientras que las líneas grises representan las cadenas del polímero inicial que es entrecruzado mediante la correspondiente estrategia de fotorreticulación (acrilatos o tiol-enos/tiol-inos).

1.2.1.2. Fotopolimerización por descomposición de sales de diazonio

Este proceso se basa en la fotodescomposición de los grupos diazonio de forma que, cuando dicho grupo se encuentra conjugado con una especie aromática, la carga

positiva queda estabilizada y se genera un carbocatión capaz de reaccionar con grupos nucleófilos.⁸¹ Comparativamente con otros procesos fotoquímicos, la fotodescomposición de sales de diazonio ha sido escasamente estudiada como método de fotopolimerización. No obstante, se ha empleado para la reticulación de polímeros con grupos hidroxilo,⁸² sulfonato⁸³ o carboxilato,⁸⁴ empleando para ello una sal de diazonio multifuncional. Además, los grupos diazonio del reticulante pueden interaccionar con los polímeros mediante interacción electrostática (grupos aniónicos)⁸³,⁸⁴,⁸⁵ o interacciones por enlaces de hidrógeno (grupos nucleófilos no aniónicos),⁸²,⁸⁶ lo que favorece la proximidad de las especies reactivas y, por lo tanto, la reacción entre el catión generado y el grupo nucleófilo del polímero.

Estos sistemas se han estudiado en la preparación de fotorresinas⁸³,⁸⁵,⁸⁷,⁸⁸ y sistemas electroópticos.⁸⁴,⁸⁶,⁸⁹,⁹⁰,⁹¹ Para llevar a cabo la reticulación de estos sistemas se ha empleado fundamentalmente una sal de diazonio polimérica obtenida por condensación de la sal de diazonio de la N-(4-aminofenil)anilina con formaldehído, lo que da lugar a un polímero, de masa molecular baja (se trata más bien de oligómeros) con una estructura no totalmente definida y que habitualmente se describe como la mostrada en el esquema 3. Esta diazorresina oligomérica también se ha utilizado en algunas aplicaciones biológicas como la fabricación de biosensores por reticulación de DNA,⁹²,⁹³ o la encapsulación de enzimas en vesículas de poliestirensulfonato (PSS).⁹⁴

⁸¹ Cao, S., Zhao, C., Cao, W. *Polym. Int.*, **1998**, *45*, 142-146.

⁸² Chen, J., Cao, W. *Chem. Commun.*, **1999**, 1711-1712.

⁸³ Cao, W., Ye, S., Cao, S., Zhao, C. *Macromol. Rapid Commun.*, **1997**, *18*, 983-989.

⁸⁴ Cao, T., Yang, S., Cao, J., Zhang, M., Huang, C., Cao, W. *J. Phys. Chem. B*, **2001**, *105*, 11941-11944.

⁸⁵ Luo, H., Yang, B., Yang, L., Cao, W. *Macromol. Rapid Commun.*, **1998**, *19*, 291-294.

⁸⁶ Zhao, S., Zhang, K., Yang, M., Sun, Y., Sun, C. *Mater. Lett.*, **2006**, *60*, 2406-2409.

⁸⁷ Zhang, Y., Cao, W. *J. Polym. Sci. A*, **2000**, *38*, 2566-2571.

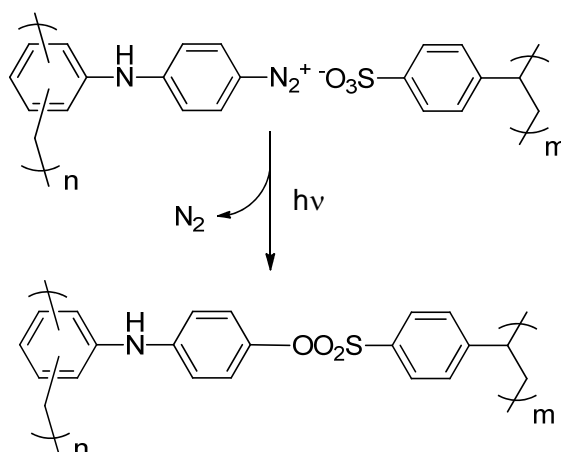
⁸⁸ Liu, J.H., Lee, S.Y., Tsai, F.R. *J. Appl. Polym. Sci.*, **1998**, *70*, 2401-2407.

⁸⁹ Cao, T., Yang, S., Yang, Y., Huang, C., Cao, W. *Langmuir*, **2001**, *17*, 6034-6036.

⁹⁰ Cao, T., Wei, L., Yang, S., Zhang, M., Huang, C., Cao, W. *Langmuir*, **2002**, *18*, 750-753.

⁹¹ Zhang, L., Peng, Z., Yao, L., Lv, F., Xuan, L. *J. Mater. Chem.*, **2007**, *17*, 3015-3022

⁹² Yu, B., Cong, H.L., Liu, H.W., Lu, C.H., Wei, F., Cao, W. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2006**, *384*, 385-390.



Esquema 3. Descomposición fotoinducida de los grupos diazonio de la sal de diazonio polimérica típicamente utilizada para reticular polímeros con grupos nucleófilos, y consiguiente reacción con los grupos nucleófilos del PSS.

1.2.2. MICROESTRUCTURACIÓN DE FOTOPOLÍMEROS

Como se ha comentado, la irradiación con luz de un material fotopolimerizable produce una transformación del mismo que pasa de estar compuesto por monómeros y macromonómeros a estar formado por una red entrecruzada. Esto provoca un cambio de solubilidad a nivel macroscópico que puede aprovecharse para eliminar la zona no expuesta a la luz utilizando un disolvente selectivo.

Al ser un proceso iniciado por la luz, la fotopolimerización puede estar controlada en el tiempo y el espacio ya que se puede elegir cuándo y dónde se quiere irradiar el material fotopolimerizable. Esto permite obtener estructuras de geometría controlada mediante diferentes técnicas de microestructuración, algunas de las cuales se van a explicar brevemente a continuación.

⁹³ Li, Q., Ouyang, J., Chen, J., Zhao, X., Cao, W. *J. Polym. Sci. A*, **2002**, *40*, 222-228.

⁹⁴ Srivastava, R., Brown, J.Q., Zhu, H., McShane, J. *Biotechnol. Bioeng.*, **2005**, *91*, 124-131.

1.2.2.1. Fotolitografía

Las técnicas fotolitográficas hacen uso de radiación electromagnética para llevar a cabo una modificación selectiva de unas zonas del material fotosensible (figura 9).^{95, 96} Mediante este proceso se introduce un cambio de solubilidad entre zonas irradiadas y no irradiadas que permite eliminar selectivamente una de estas zonas. En las técnicas de fotolitografía con máscara, la irradiación a través de ésta se realiza con un haz de luz colimado. La máscara, con zonas transparentes y opacas, se pone en contacto con la película fotosensible de manera que el proceso de irradiación permite transferir el patrón de la máscara a la fotorresina. En el caso de materiales fotopolimerizables, como los mencionados en el apartado 1.2.1, la irradiación produce la polimerización del material en las zonas irradiadas (fotorresinas negativas), disminuyendo la solubilidad en estas regiones. El uso de un disolvente selectivo elimina el monómero de las zonas no irradiadas quedando al descubierto las zonas irradiadas fijadas al sustrato. Esta técnica permite preparar estructuras de relieve superficial sobre un sustrato, quedando éste expuesto en las regiones no irradiadas. Existen otro tipo de resinas fotosensibles en las que las zonas irradiadas son las que se pueden eliminar con un disolvente selectivo (fotorresina positiva). Este tipo de resinas están basadas en sistemas que al ser expuestos a la luz evitan una posterior polimerización térmica o que producen una despolimerización del material. De esta forma, tras el lavado se obtiene una estructura polimérica que corresponde a las zonas opacas de la máscara, quedando el sustrato

⁹⁵ Nie, Z., Kumacheva, E. *Nat. Mater.*, **2008**, 7, 277-290.

⁹⁶ De Witz, C., Sánchez, C., Bastiaansen, C., Broer, D.J. *Nano- and Microstructuring of Polymers*. Meyer, T., Keurentjes, J. (Editors). *Handbook of Polymer Reaction Engineering*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, **2008**, p.995-1014.

expuesto en las zonas en las que el polímero fue irradiado. Un ejemplo de las fotorresinas positivas son las basadas en diazidas.⁹⁷

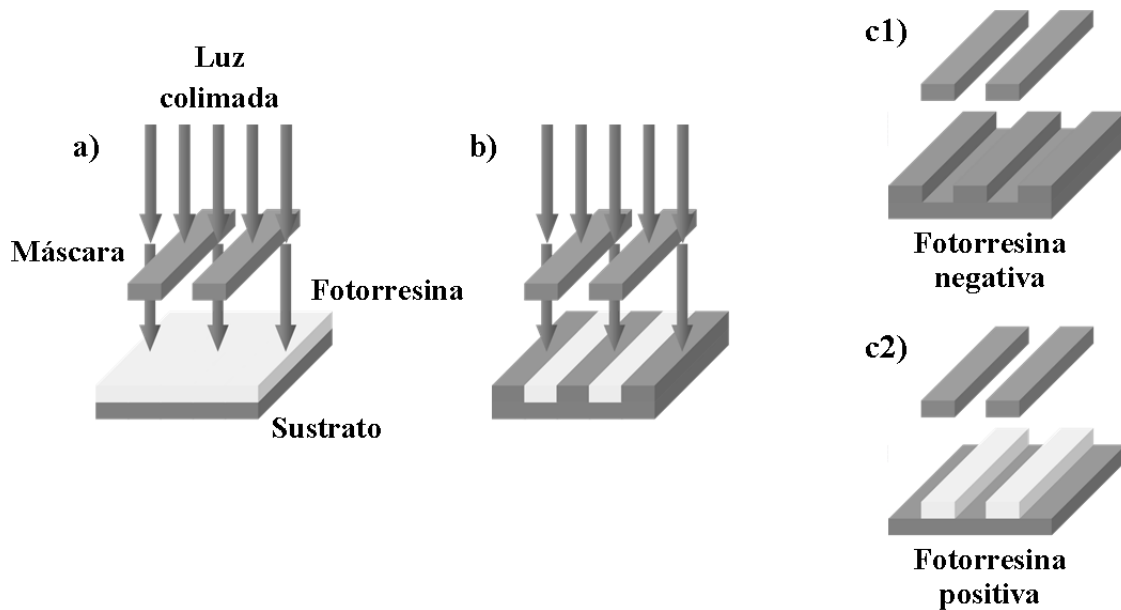


Fig. 9. Fabricación de microestructuras mediante fotolitografía con máscara. La película de material fotosensible es irradiada selectivamente con una fuente de luz colimada que atraviesa una máscara con zonas opacas y zonas transparentes (a). La irradiación provoca la reacción fotoinducida (b) de forma que se pueden eliminar selectivamente las zonas expuestas (c1) o no expuestas (c2) mediante el lavado con un disolvente.

La fotolitografía permite la fabricación de un gran número de estructuras con resoluciones en el orden de la longitud de onda de irradiación a partir de una máscara. Esta capacidad ha convertido a la fotolitografía en una pieza clave en la fabricación masiva de circuitos y dispositivos microelectrónicos.

Alternativamente a la irradiación a través de una máscara puesta en contacto con la película de fotorresina, el proceso de sensibilización puede realizarse mediante un

⁹⁷ Miyagawa, K., Naruse, K., Ohnishi, S., Yamaguchi, K., Seko, K., Numa, N., Iwasawa, N. *Prog. Org. Coat.*, **2001**, *42*, 20-28.

sistema de proyección, en el que la imagen de la máscara es proyectada con un sistema óptico adecuado sin necesidad de contacto con la muestra.

1.2.2.2. Técnicas de escritura láser

El proceso de sensibilización selectiva de fotopolímeros descrito en el apartado anterior también puede llevarse a cabo mediante un haz de luz láser focalizado en la muestra que provoca la fotopolimerización de la zona irradiada (figura 10). En estas técnicas de escritura la irradiación se hace punto a punto (haz de luz láser fijo focalizado sobre un punto) de tal forma que, al mover la película de material fotopolimerizable (o el haz de luz láser), se puede obtener un dibujo predeterminado. Al igual que en la fotolitografía con máscara descrita, tras la irradiación de unas zonas determinadas se lleva a cabo la eliminación de las zonas no irradiadas mediante el lavado con un disolvente selectivo. Esta técnica de fabricación ofrece una gran libertad para crear estructuras de diferentes geometrías, sin necesidad de una máscara para cada diseño, mediante herramientas informáticas, reduciendo costes y tiempos de fabricación en series cortas. Al igual que las fotolitografías con máscara, la resolución alcanzada con este tipo de técnicas de escritura con láser, está limitada por la difracción de la luz y es por lo tanto del orden de la longitud de onda de la luz.

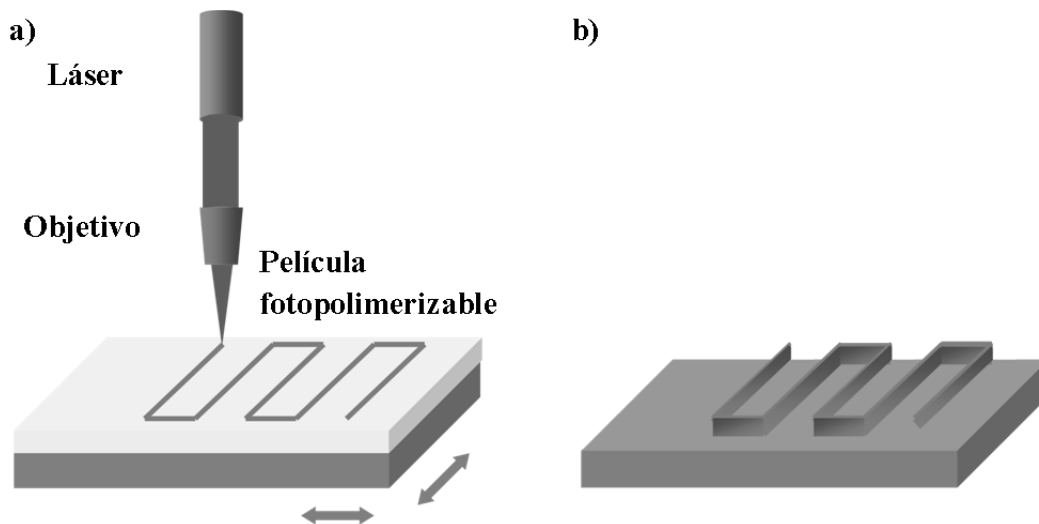


Fig. 10. Fabricación de microestructuras mediante escritura directa con láser. La película fotopolimerizable es irradiada selectivamente con un haz de luz láser (a) de forma que las zonas no expuestas pueden ser eliminadas selectivamente con un disolvente (b).

La sensibilización puede también llevarse a cabo mediante el uso de pulsos láser ultracortos (duración del pulso inferior al picosegundo) en el IR, fuera del rango de absorción de los fotopolímeros. Así se ha conseguido inducir en materiales fotopolimerizables basados en acrilatos procesos de absorción a dos fotones del fotoiniciador, generándose de este modo radicales que comienzan el proceso de polimerización. Al tratarse de procesos a dos fotones la probabilidad de absorción aumenta cuadráticamente con la intensidad de manera que la formación de radicales tiene lugar, de manera significativa, donde la intensidad de la luz es elevada. De esta manera, la polimerización tiene lugar fundamentalmente en el punto focal, donde la intensidad de la luz es máxima. Estos procesos permiten la obtención de resoluciones por debajo de la longitud de onda de la luz, por lo que este tipo de técnicas se han

utilizado en diversos campos como la fotónica o la fabricación de biomateriales con motivos geométricos con tamaños de decenas o centenas de nanómetros.⁹⁸

Mediante el uso de estas técnicas de microestructuración con un haz de luz láser focalizado es posible generar estructuras tridimensionales. Así, la estereolitografía permite obtener estructuras tridimensionales (3D) mediante la generación de sucesivas capas bidimensionales (2D). En este caso, la luz láser es focalizada sobre la superficie de una resina fotopolimerizable. La posición del haz está controlada por ordenador de forma que puede moverse en el plano XY para crear una estructura bidimensional de geometría controlada (figura 11). A continuación, una plataforma móvil desplaza hacia abajo la capa de material reticulado de forma que ésta queda cubierta con una nueva capa delgada de resina fotopolimerizable. Esta nueva capa de resina se fotopolimeriza de la misma forma y así sucesivamente hasta obtener un objeto tridimensional. Esta técnica tiene utilidad en diversas aplicaciones como la fabricación de microtransductores, o en la preparación de implantes ya que permite el prototipado rápido.^{99, 100}

⁹⁸ Zhang, Y.L., Chen, Q.D., Xia, H., Sun, H.B. *Nano Today*, **2010**, 5, 435-448.

⁹⁹ Dufaud, O., Le Gall, H., Corbel, S. *Chem. Eng. Res. Des.*, **2005**, 83, 133-138.

¹⁰⁰ Melchels, F.P.W., Feijen, J., Grijpma, D.W. *Biomaterials*, **2010**, 31, 6121-6130.

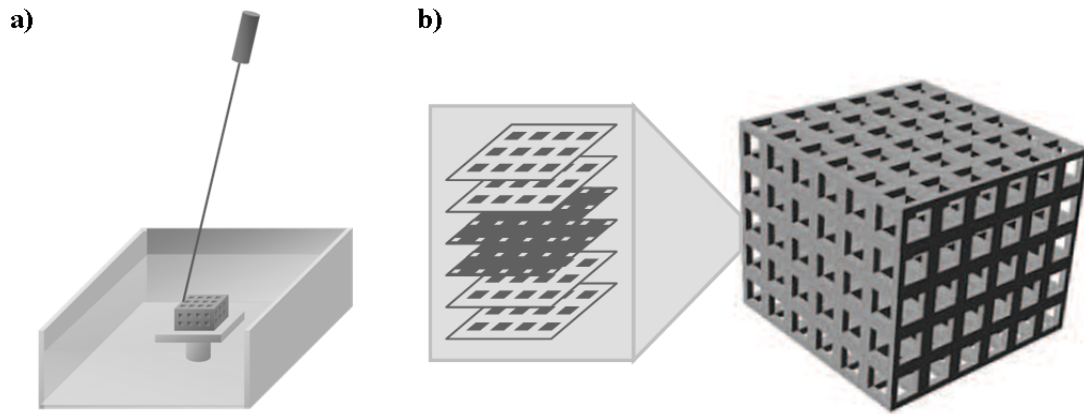


Fig. 11. Sistema para la fabricación de estructuras tridimensionales mediante estereolitografía (a). Componente tridimensional obtenido mediante apilamiento de sucesivas capas bidimensionales (b).

1.2.2.3. Otras técnicas de microestructuración de fotopolímeros

Existen otras técnicas que permiten llevar a cabo un proceso de estructuración mediante el moldeo de una resina fotopolimerizable y una posterior irradiación con luz. Esta irradiación provoca la fotopolimerización del material, que mantiene la estructura complementaria del molde o sello.

Una de las técnicas más importantes en este grupo, es la litografía por nanoimpresión (*nanoimprinting lithography* - NIL) con una resina líquida fotopolimerizable curada con luz UV (UV-NIL). En esta técnica, la estructuración se consigue realizando presión con un sello transparente sobre una capa de resina líquida fotopolimerizable.^{101, 102} Una vez estructurada, la resina fotopolimerizable es irradiada para llevar a cabo su polimerización. La resolución de esta técnica está en el orden de las decenas de nanómetros (mejor resolución que la obtenida mediante otras técnicas como la fotolitografía o la escritura láser que están limitadas por la difracción de la luz)

¹⁰¹ Guo, L.J. *Adv. Mater.*, **2007**, *19*, 495-513.

¹⁰² Guo, L.J. *J. Phys. D.* **2004**, *37*, 123-141.

y permite la fabricación a gran escala de estructuras a partir de un sello. A diferencia de las fotolitografías descritas anteriormente, en las estructuras obtenidas mediante UV-NIL queda una película residual en las zonas correspondientes a salientes del sello (véase figura 12). Esta película se puede eliminar mediante la irradiación con un haz de iones, que elimina una fina capa de las estructuras generadas.

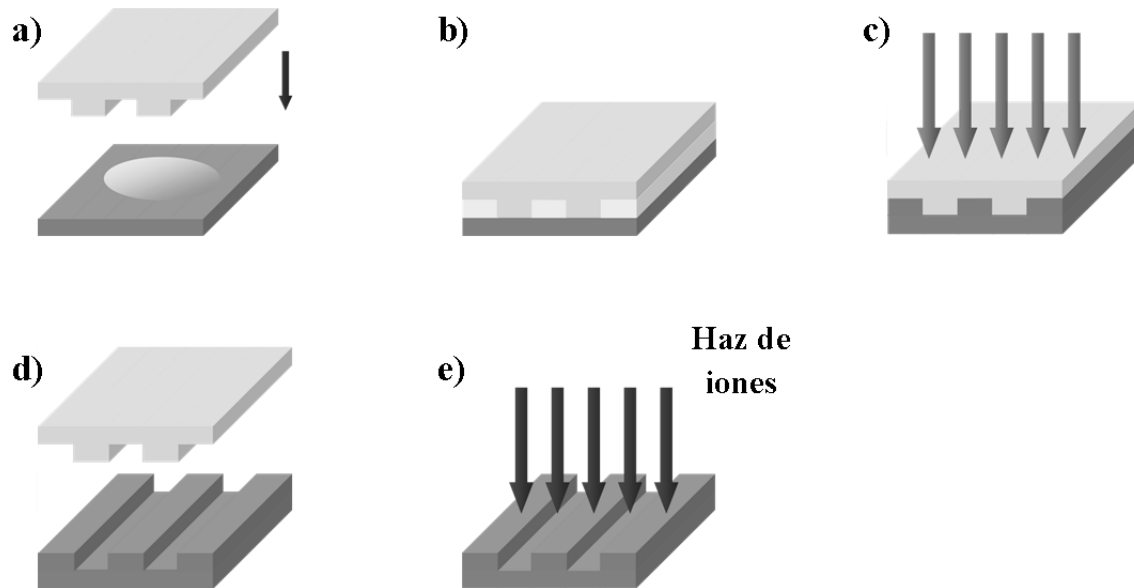


Fig. 12. Fabricación de microestructuras mediante litografía por nanoimpresión con luz UV (UV-NIL). La resina líquida fotopolimerizable se estructura con un sello transparente (a, b) se irradia con luz UV (c) para dar lugar a un material micro o nanoestructurado (d). La capa de material residual que queda en las zonas más finas se elimina con un haz de iones (e).

Existen otras alternativas basadas en moldes transparentes como el *micromoldeo por capilares* (MIMIC)¹⁰³ que evitan la formación de esta película residual en todo el sustrato. En esta técnica la estructuración de la resina fotopolimerizable se hace colocando el sello sobre el sustrato de forma que haya contacto conformal entre ambas superficies, y a continuación se llenan los huecos entre el sustrato y las hendiduras del

¹⁰³ Xia, Y., Whitesides, G.M. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1998**, 28, 153-184.

sello con la resina fotopolimerizable que se introduce en estos huecos por capilaridad. A continuación se irradia (al igual que en la técnica de UV-NIL) para curar el fotopolímero de modo que al retirar el sello queda el patrón complementario (o réplica inversa) en el que el sustrato queda expuesto al aire en las zonas correspondientes a los salientes del molde (figura 13).

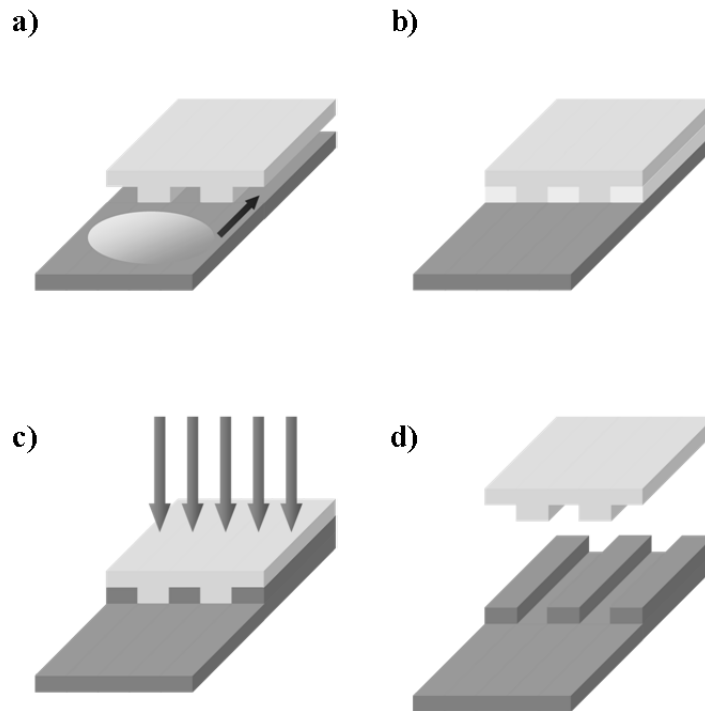


Fig. 13. Fabricación de microestructuras mediante micromoldeo por capilares (MIMIC). Pegado del sello al vidrio por contacto conformal (a), llenado de huecos por capilaridad (b), irradiación con luz UV (c) y retirada del sello (d).

En este apartado 1.2.2 se han revisado brevemente algunas de las técnicas disponibles para la estructuración de fotopolímeros. Cada una de estas técnicas posee ventajas e inconvenientes en cuanto a resolución, procesabilidad, rendimiento o coste, por lo que la utilización de una u otra técnica va a depender de las necesidades específicas del proceso de estructuración.

1.3. BIOMATERIALES BASADOS EN FOTOPOLÍMEROS

Cómo se ha descrito en el primer apartado de este capítulo de Antecedentes, el desarrollo de biomateriales para aplicaciones biomédicas requiere del control de diferentes parámetros tales como la velocidad de degradación, la composición química, las propiedades mecánicas o la estructura^{18, 19, 20} Las particularidades de las reacciones de fotopolimerización (reacciones rápidas y eficientes, a temperatura ambiente y desencadenadas por un estímulo externo desacoplado de la temperatura u otro cambio químico) así como la posibilidad de estructuración (control espacio-temporal) han hecho de éstas, unas técnicas muy atractivas para la preparación de biomateriales. Este tipo de reacciones permite además modificar las propiedades del material (por ejemplo las mecánicas) controlando la estructura química del monómero,³⁴ el tipo de grupo reactivo,^{76, 77} o el porcentaje de agente reticulante⁷⁹ entre otros factores que intervienen en la reacción de fotopolimerización. Todas estas características permiten llevar a cabo la preparación de biomateriales estructurados y con propiedades controladas de una manera rápida y sencilla.

Entre las reacciones de fotopolimerización conocidas, la más empleada dentro del campo de biomateriales es la polimerización radicalaria de acrilatos que se ha utilizado para diversas aplicaciones en Medicina. Sin embargo, el proceso de fotopolimerización basado en la química de tiol-enos ha suscitado un gran interés últimamente ya que evita la formación de cadenas carbonadas no biodegradables como ocurre en el caso de los poliacrilatos. Esto supone una ventaja en determinadas aplicaciones biomédicas en las que es deseable una completa degradación del material. En los siguientes apartados se hará una revisión de la bibliografía sobre preparación de biomateriales por fotopolimerización mediante estas dos reacciones, la de acrilatos por

ser referente en este campo de trabajo y la de tiol-enos por ser antecedente directo de la de tiol-inos (estudiada en esta memoria). En el caso concreto de la fotodescomposición de sales de diazonio, no hay referencias previas en el campo de biomateriales (salvo las derivadas de esta tesis doctoral).

1.3.1. FOTOPOLIMERIZACIÓN RADICALARIA DE ACRILATOS EN BIOMATERIALES

Los acrilatos se han utilizado en diversas aplicaciones médicas como la fabricación de cementos acrílicos. Para ello se han preparado sistemas inyectables basados en acrilatos con iniciadores radicalarios térmicos.⁷ Se han estudiado también la formación de hidrogeles mediante polimerización de monómeros hidrófilos funcionalizados con grupos acrílicos.³² Estos hidrogeles, que se pueden formar por vía térmica, pueden también ser generados por fotopolimerización. Tienen aplicación tanto en la fabricación de lentes de contacto como en la preparación de sistemas implantables tales como suturas, sistemas para liberación controlada de fármacos o andamiajes para Ingeniería de Tejidos. En los siguientes apartados se va a hacer una revisión de los estudios llevados a cabo en la preparación de biomateriales mediante fotopolimerización de monómeros y macromonómeros acrílicos sintéticos y derivados de polímeros naturales.

1.3.1.1. Fotopolimerización de polímeros sintéticos

Dentro de los polímeros sintéticos, el PEG es el más utilizado en la obtención de hidrogeles por fotopolimerización para aplicaciones médicas debido a su alta

biocompatibilidad y su hidrofilia. Para obtener estos hidrogeles el PEG se funcionaliza por uno o los dos extremos hidroxilo terminales con grupos acrilato que posteriormente fotopolimerizarán. Estas redes acrílicas de PEG se han utilizado por ejemplo en liberación controlada de fármacos en las que se puede encapsular éstos llevando a cabo el proceso de fotopolimerización en presencia del mismo. Se puede modificar además el perfil de liberación del fármaco controlando la permeabilidad del gel,¹⁰⁴ parámetro que depende, junto con otros como la hidrofilia o las propiedades mecánicas del material, del grado de reticulación de la red polimérica.¹⁰⁴ Peppas y colaboradores llevaron a cabo un estudio en el que, por copolimerización de cadenas de PEG mono y difuncionalizadas con grupos acrilato (mezclados en distintas proporciones), podían obtener materiales con distinta permeabilidad y por lo tanto, con distinto perfil de liberación.¹⁰⁵ Además del PEG, otros monómeros acrílicos hidrófilos como el metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) también han sido estudiados para la preparación de hidrogeles para encapsular células y preparar dispositivos para terapia celular.^{106, 107}

Los materiales basados en PEG (u otros polímeros hidrófilos) dan lugar a superficies con baja adhesión celular debido a su hidrofilia, por lo que también se han utilizado para reducir la adhesión celular en procesos postoperatorios y evitar así la adhesión entre tejidos.^{108, 109} Para su utilización en Ingeniería de Tejidos se requiere modificar el material de forma que se favorezca la adhesión celular sobre el mismo. Esto se puede conseguir mediante copolimerización del PEG con un

¹⁰⁴ Lin, C.C., Anseth, K.S. *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 631-643.

¹⁰⁵ Peppas, N.A., Keys, K.B., Torres-Lugo, M., Lowman, A.M. *J. Control. Release.*, **1999**, *62*, 81-87.

¹⁰⁶ Campioni, E.G., Nobrega, J.N., Sefton, M.V. *Biomaterials*, **1998**, *19*, 829-837.

¹⁰⁷ Mokrý, J., Karbanova, J., Lukas, J., Palecková, V., Dvoránková, B. *Biotechnol. Prog.*, **2000**, *16*, 897-904.

¹⁰⁸ Sawhney, A.S., Pathak, C.P., Van Rensburg, J.J., Dunn, R.C., Hubbell, J.A. *J. Biomed. Mater. Res.*, **1994**, *28*, 831-838.

¹⁰⁹ Han, D.K., Hubbell, J.A. *Macromolecules*, **1997**, *30*, 6077-6083.

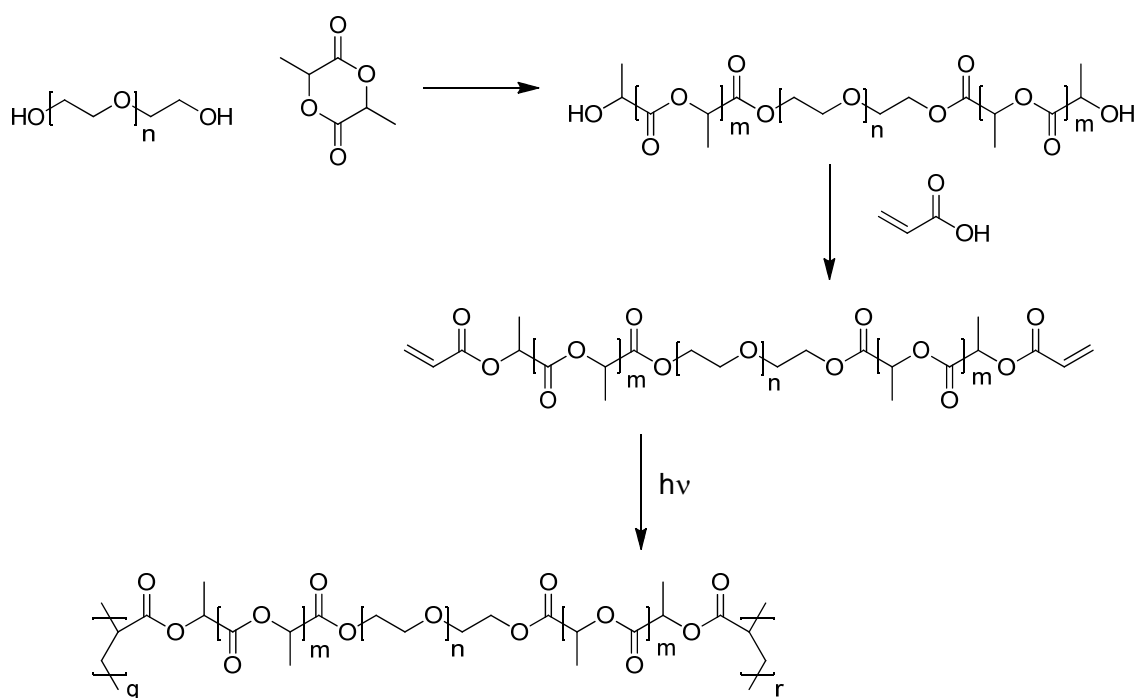
polihidroxicanoato como la polilactida (PLA)^{110, 111} o el ácido poliglicólico (PGA),¹¹² que al tener un carácter más hidrófobo, favorecen la adhesión celular (además de introducir grupos hidrolíticamente lábiles y favorecer la degradación del material). Para preparar estos materiales se puede utilizar el PEG para iniciar la polimerización de la lactona cíclica dando lugar a un copolímero bloque cuyos extremos contienen grupos hidroxilo. Estos grupos OH terminales se pueden funcionalizar con derivados acrílicos que participarán en el proceso de fotopolimerización en cadena (esquema 4). Estas redes acrílicas de PEG y polihidroxicanoatos permiten controlar diversas propiedades como la adhesión celular, la degradación o las propiedades mecánicas modificando diversos factores como la relación de los bloques hidrófilo (PEG) e hidrófobo (polihidroxicanoato),³⁸ el grado de reticulación^{110, 111} o el tipo de grupo reactivo.¹¹² Han sido estudiados como geles para sistemas de liberación controlada de fármacos¹¹¹ y como andamiajes para el crecimiento celular,^{38, 111, 112} En este último caso se han llevado a cabo estudios en los que se ha encapsulado células en el interior del hidrogel, llevando a cabo la fotopolimerización en presencia de las células.^{111, 113} Esto las sitúa en un entorno tridimensional cuya estructura y propiedades pueden influir notablemente en el crecimiento celular. Anseth y colaboradores llevaron a cabo la encapsulación de condrocitos por fotopolimerización de derivados acrílicos de PEG demostrando que el grado de reticulación, que afecta a las propiedades físico-químicas como las mecánicas, puede influir también en la morfología de las células.¹¹³

¹¹⁰ Metters, A.T., Anseth, K.S., Bowman, C.N. *Polymer*, **2000**, *41*, 3993-4004.

¹¹¹ Anseth, K.S., Metters, A.T., Bryant, S.J., Martens, P.J., Elisseff J.H., Bowman, C.N. *J. Control. Release*, **2002**, *78*, 199-209.

¹¹² Bencherif, S.A., Srinivasan, A., Sheehan, J.A., Walker, L.M., Gayathri, C., Gil, R., Hollinger, J.O., Matyjaszewski, K., Washburn, N.R. *Acta Biomater.*, **2009**, *5*, 1872-1883.

¹¹³ Bryant, S.J., Anseth, K.S., Lee, D.A., Bader, D.L. *J. Orthop. Res.*, **2004**, *22*, 1143-1149.



Esquema 4. Síntesis de un copolímero bloque de PEG y PLA, posterior funcionalización y fotopolimerización de los mismos para la obtención de una red acrílica biodegradable.

Otra alternativa para favorecer la adhesión celular en los hidrogeles obtenidos por fotopolimerización de derivados acrílicos del PEG es anclar en la red polimérica diversas señales biológicas como péptidos de adhesión o factores de crecimiento con los que las células puedan interactuar, favoreciéndose así la adhesión celular.^{39, 114} Estas señales biológicas pueden conjugarse con el PEG para posteriormente funcionalizar el polímero (PEG y secuencia peptídica) con grupos acrilato y llevar a cabo el proceso de fotopolimerización,^{115, 116, 117, 118} o puede llevarse a cabo el anclaje de la biomolécula

¹¹⁴ Tibbitt, M.W., Anseth, K.S. *Biotechnol. Bioeng.*, **2009**, *103*, 655-663.

¹¹⁵ Underhill, G.H., Chen, A.A., Albrecht, D.R., Bhatia, S.N. *Biomaterials*, **2007**, *28*, 256-270.

¹¹⁶ Gobin, A.S., West, J.L. *FASEB J.*, **2002**, *16*, 751-760.

¹¹⁷ Weber, L.M., Hayda, K.N., Haskins, K., Anseth, K.S. *Biomaterials*, **2007**, *28*, 3004-3011.

¹¹⁸ Nuttelman, C.R., Tripodi, M.C., Anseth, K.S. *Matrix Biol.*, **2005**, *24*, 208-218.

una vez formada la red polimérica.¹¹⁹ Estas estrategias permiten controlar la cantidad de biomoléculas presentes en el material, parámetro que influye en la respuesta celular.¹²⁰

También se ha estudiado la posibilidad de llevar a cabo la fotopolimerización del derivado acrílico del PEG en presencia de polímeros naturales bioactivos para aplicaciones en Ingeniería de Tejidos. Es el caso del ácido hialurónico que mejora la adhesión y proliferación celular con respecto a las redes acrílicas de PEG simples.¹²¹

1.3.1.2. Fotopolimerización de polímeros naturales

Algunos polímeros naturales, como las proteínas de la ECM o algunos polisacáridos, también han sido modificados con derivados acrílicos para generar hidrogeles por fotopolimerización radicalaria de estos grupos reactivos. Estos hidrogeles tienen especial interés en Ingeniería de Tejidos ya que la estructura química única del polímero natural puede favorecer la adhesión celular u otros procesos biológicos.

Uno de los polímeros naturales más utilizados para la fabricación de andamiajes es el ácido hialurónico^{122, 123, 124, 125} ya que, al estar presente en la ECM de multitud de tejidos vivos, presenta gran bioactividad en este tipo de aplicaciones. Por ejemplo, Anseth y colaboradores describieron como los productos de degradación de las cadenas de ácido hialurónico pueden favorecer la proliferación de células vasculares.¹²² Estos

¹¹⁹ Park, K.H., Na, K., Chung, H.M. *Biotechnol. Lett.*, **2005**, *27*, 227-231.

¹²⁰ Massia, S.P., Hubbell, J.A. *J. Cell Biol.*, **1991**, *114*, 1089-1100.

¹²¹ Kutty, J.K., Cho, E., Lee, J.S., Vyavahare, N.R., Webb, K. *Biomaterials*, **2007**, *28*, 4928-4938.

¹²² Masters, K.S., Shah, D.N., Leinwand, L.A., Anseth, K.S. *Biomaterials*, **2005**, *26*, 2517-2525.

¹²³ Patterson, J., Siew, R., Herring, S.W., Lin, A.S.P., Guldberg, R., Stayton, P.S. *Biomaterials*, **2010**, *31*, 6772-6781.

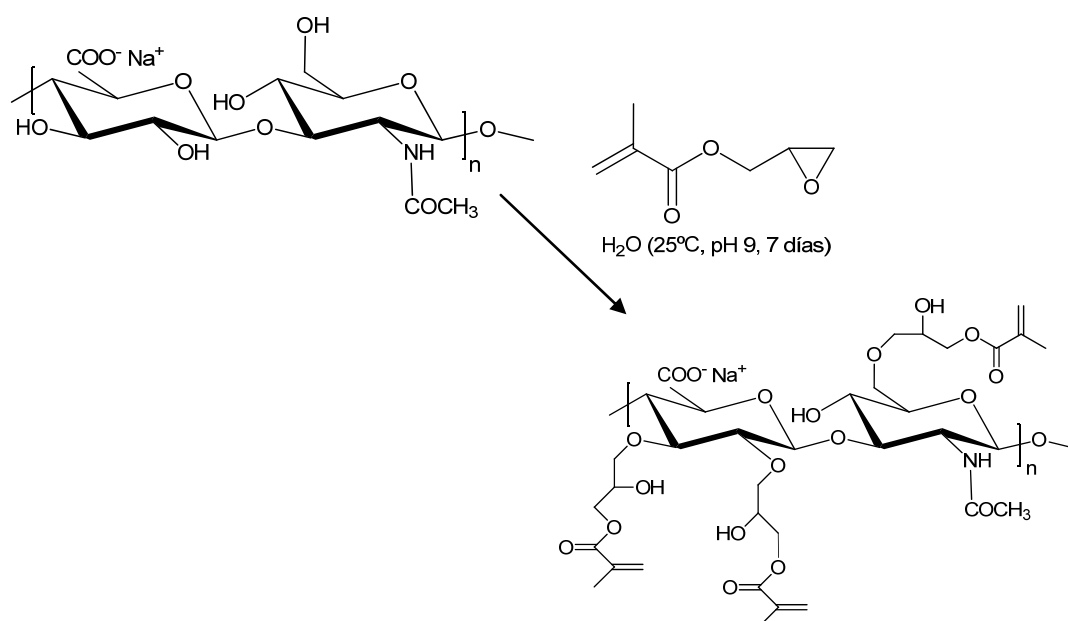
¹²⁴ Chung, C., Mesa, J., Miller, G.J., Randolph, M.A., Gill, T.J., Burdick, J.A. *Tissue Eng.*, **2006**, *12*, 2665-2673.

¹²⁵ Smeds, K.A., Pfister-Serres, A., Hatchell, D.L., Grinstaff, M.W. *J. Macromol. Sci. A*, **1999**, *36*, 981-989.

materiales permiten además la encapsulación de las células si la fotorreticulación del polímero natural se realiza en presencia de las mismas^{122, 124} (al igual que sucedía con los derivados acrílicos del PEG), o permiten la encapsulación de biomoléculas que pueden favorecer o dirigir el proceso regenerativo al ser liberadas conforme se degrada el material.¹²³

La obtención de estos materiales requiere una funcionalización previa del ácido hialurónico con grupos acrílicos fotopolimerizables. Para ello pueden utilizarse los grupos hidroxilo del polímero que pueden reaccionar con grupos electrófilos como anhídridos^{122, 124, 125} o epóxidos¹²³ (esquema 5). Adicionalmente, se pueden utilizar los grupos carboxílicos del ácido hialurónico para funcionalizar las cadenas del polímero. Esta estrategia ha sido utilizada por Park y colaboradores para introducir otras funcionalidades como cadenas de Pluronic® (un copolímero bloque sensible a la temperatura basado en óxidos de etileno y propileno), que permiten fabricar sistemas termosensibles útiles, por ejemplo, en terapia celular.¹²⁶ Estos sistemas se utilizan para encapsular células que generan biomoléculas (por ejemplo colágeno y actina en este caso) que pueden ser liberadas al exterior y favorecer un proceso curativo. En este caso el Pluronic ® evita la gelificación del material (a la temperatura corporal) y favorece la liberación de estas sustancias en el organismo.

¹²⁶ Lee, H., Park, T.G. *J. Biomed. Mater. Res.*, **2009**, 88, 797-806.



Esquema 5. Funcionalización de los grupos hidroxilo del ácido hialurónico mediante reacción con metacrilato de glicidilo.¹²³

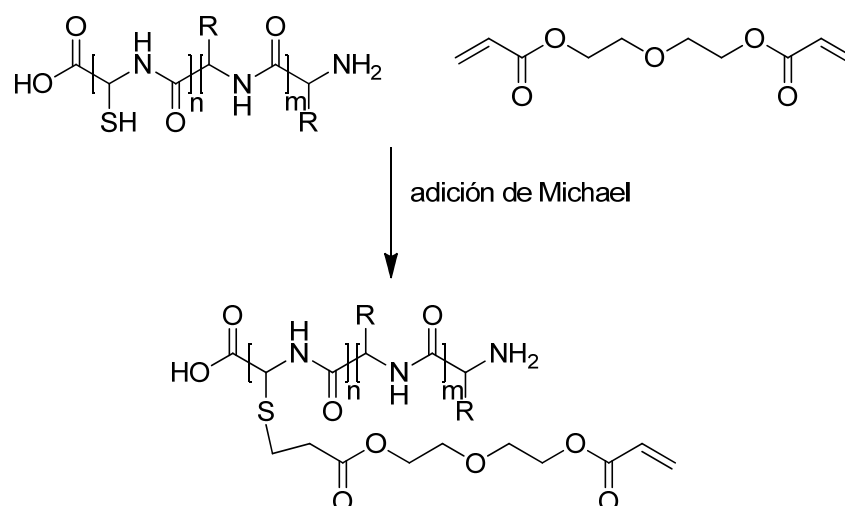
Otros polímeros naturales como el quitosano,¹²⁷ el sulfato de condroitina¹²⁸ o el fibrinógeno (precursor de la fibrina)¹²⁹ también se han utilizado como base para formar redes acrílicas. En el caso del quitosano, que contiene grupos amino nucleófilos, y el sulfato de condroitina, con grupos hidroxilo nucleófilos, el polímero puede ser funcionalizado por reacción de estos grupos nucleófilos con grupos electrófilos, tal y como se acaba de describir para el ácido hialurónico. Estos materiales pueden utilizarse por ejemplo en la preparación de resinas fotopolimerizables que permiten la fotopolimerización *in vivo* del material, lo que favorece la integración del implante en el tejido vivo tal y como se ha demostrado con el uso de derivados acrílicos del sulfato de condroitina.¹²⁸ El fibrinógeno, por su parte, se puede funcionalizar con grupos acrilato

¹²⁷ Li, Q., Yang, D., Ma, G., Xu, Q., Chen, X., Lu, F., Nie, J. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2009**, *44*, 121-127.

¹²⁸ Wang, D.A., Varghese, S., Sharma, B., Strehin, I., Fermanian, S., Gorham, J., Fairbrother, D.H., Cascio, B., Elisseeff, J.H. *Nat. Mater.*, **2007**, *6*, 385-392.

¹²⁹ Almany, L., Seliktar, D. *Biomaterials*, **2005**, *26*, 2467-2477.

mediante una adición de Michael de los grupos tiol del polímero (contenidos en el aminoácido cisteína del mismo) a los grupos acrílicos de un compuesto bifuncional (esquema 6). Al añadir este compuesto en exceso, tras la funcionalización quedan grupos fotopolimerizables libres capaces de formar entrecruzamientos durante el proceso de fotopolimerización.



Esquema 6. Funcionalización del fibrinógeno con derivados acrílicos de PEG mediante adición de tipo Michael.¹²⁹

1.3.1.3. Estructuración con luz de fotopolímeros acrílicos en biomateriales

En el apartado 1.1.1.2 se ha comentado que el andamiaje para la regeneración de un tejido vivo ha de mimetizar, en la medida de lo posible, al tejido vivo natural. Esto incluye la microestructura ya que en la mayor parte de tejidos, como por ejemplo el vascular, las fibras de la ECM que actúan como soporte estructural (y las propias células alojadas en la ECM) presentan una determinada orientación que provoca una respuesta anisótropa de dichas células y del tejido.¹³⁰ Estudios detallados de la ECM han

¹³⁰ Engelmayr, G.C., Cheng, M., Bettinger, C.J., Borenstein, J.T., Langer, R., Freed, L.E. *Nat. Mater.* **2008**, 7, 1003-1010.

mostrado un gran nivel de complejidad en la composición química y la topografía de la superficie, que presenta determinadas características geométricas a escala micro y nanométrica que son específicas para cada tejido. Estas características topográficas podrían servir de pista biológica para las células que pueden modificar su adhesión, movilidad, orientación o incluso diferenciación.^{18, 19, 20, 22}

La influencia de la estructura o la topografía superficial en el comportamiento celular se ha utilizado para controlar la morfología y dirigir la actividad de las células en andamiajes tridimensionales porosos^{131, 132} o sustratos planos^{133, 134, 135} generados artificialmente. En este marco, la posibilidad de estructurar los fotopolímeros para poder generar andamiajes con arquitectura y topografía definidas hacen de estos materiales una plataforma muy interesante para aplicaciones en Ingeniería de Tejidos. Entre los diferentes procesos de fotopolimerización, la polimerización radicalaria de acrilatos ha sido el más utilizado en la generación de andamiajes por lo que a continuación se va a revisar brevemente su aplicación para este fin.

La estereolitografía, descrita en el apartado 1.2.2.2., permite crear andamiajes porosos tridimensionales a partir de resinas de fotopolímeros. Al ser una técnica de escritura con láser, puede aplicarse para generar andamiajes *a la carta* cuyo diseño puede definirse con precisión mediante herramientas informáticas que permitan controlar el proceso de irradiación. La combinación de técnicas de imagen médica con esta técnica de estructuración permite obtener andamiajes que además de tener la estructura porosa adecuada, tengan un tamaño y una forma personalizados según el

¹³¹ Zhang, F., He, C., Cao, L., Feng, W., Wang, H., Mo, X., Wang, J. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2011**, *48*, 474-481.

¹³² Kim, K., Dean, D., Wallace, J., Breithaupt, R., Mikos, A.G., Fisher, J.P. *Biomaterials*, **2011**, *32*, 3750-3763.

¹³³ Bettinger C.J., Orrick, B., Misra, A., Langer, R., Borenstein, J.T. *Biomaterials*, **2006**, *27*, 2558-2565.

¹³⁴ Estévez, M., Fernández-Ulibarri, I., Martínez, E., Egea, G., Samitier, J. *Soft Matter*, **2010**, *6*, 582-590.

¹³⁵ Schulte, V.A., Díez, M., Möller, M., Lensen, M.C. *Biomacromolecules*, **2009**, *10*, 2795-2801.

tejido dañado del paciente.^{136, 137, 138} Además, al ser un proceso de fabricación por capas, se pueden preparar andamiajes con una composición variable.¹³⁹

Típicamente, estos andamiajes tienen dimensiones milimétricas y están formados por estructuras geométricas sencillas con poros interconectados (figura 14) para permitir la migración celular y el transporte de nutrientes a través del mismo.^{140, 141,}
¹⁴² El tamaño de los poros, así como de los motivos geométricos que conforman la estructura, suele estar en el orden de las dimensiones celulares (decenas o centenas de micras) y puede controlarse durante el proceso de fabricación. Este control de la microestructura junto con la elección de los monómeros permite modular las propiedades físico-químicas del andamiaje^{143, 132} y por ello la respuesta celular.¹³²

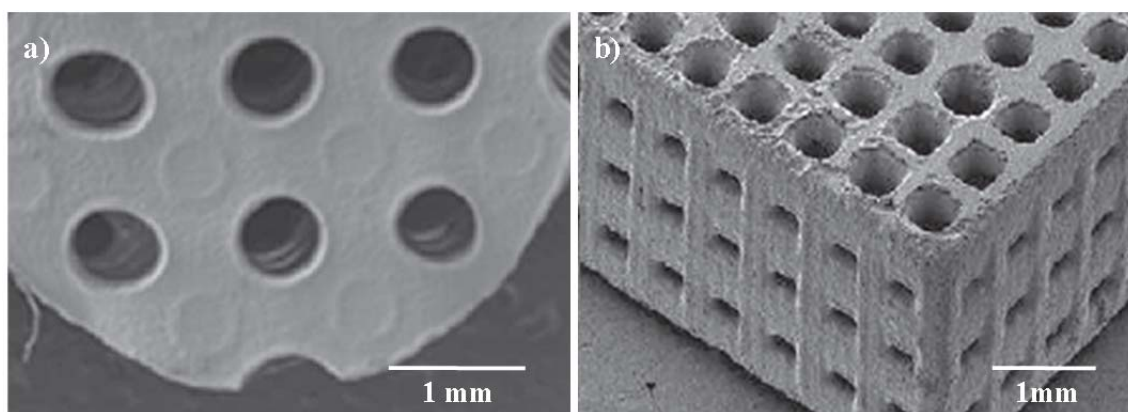


Fig. 14. Imágenes de SEM de andamiajes porosos generados por estereolitografía en formulaciones fotopolimerizables mediante reacción radicalaria de acrilatos.^{132, 143}

¹³⁶ Hutmacher, D.W., Sittinger, M., Risbud, M.V. *Trends Biotechnol.*, **2004**, 22, 354-362.

¹³⁷ Liska, R., Schuster, M., Inführ, R., Turecek, C., Fritscher, C., Seidl, B., Schmidt, V., Kuna, L., Haase, A., Varga, F., Lichtenegger, H., Stampfl, J. *J. Coat. Technol. Res.*, **2007**, 4, 505-510.

¹³⁸ Schuster, M., Turecek, C., Weigel, G., Saf, R., Stampfl, J., Varga, F., Liska, R. *J. Polym. Sci. A*, **2009**, 47, 7078-7089.

¹³⁹ Choi, J.W., Kim, H.C., Wicker, R. *J. Mater. Process. Technol.*, **2011**, 211, 318-328.

¹⁴⁰ Matsuda, T., Mizutani, M. *J. Biomed. Mater. Res.*, **2002**, 62, 395-403.

¹⁴¹ Melchels, F.P.W., Feijen, J., Grijpma, D.W. *Biomaterials*, **2010**, 31, 6121-6130.

¹⁴² Barry, J.J.A., Evseev, A.V., Markov, M.A., Upton, C.E., Scotchford, C.A., Popov, V.K., Howdle, S.M. *Acta Biomater.*, **2008**, 4, 1603-1610.

¹⁴³ Lee, K.W., Wang, S.F., Fox, B.C., Ritman, E.L., Yaszemski, M.J., Lu, L.C. *Biomacromolecules*, **2007**, 8, 1077-1084.

Las técnicas de fotolitografía y de UV-NIL permiten generar superficies micro y nanoestructuradas sobre las que llevar a cabo el cultivo celular. La topografía de estas superficies puede tener una influencia importante en la respuesta celular tal y como se ha visto en diversos estudios. Así por ejemplo, los estudios de proliferación celular llevados a cabo sobre superficies de materiales bioestables como acrilatos o poliuretanos consistentes en una topografía periódica de líneas han demostrado la posibilidad de inducir una orientación preferente de las células.^{144, 145} En estas estructuras periódicas, cuyas líneas tienen alturas menores de la micra y están separadas por una distancia entre unas pocas micras y unas pocas decenas de micras, se ha probado que el grado de orientación de las células depende del espaciado entre las líneas, lo cual puede controlarse mediante el uso de estas técnicas de estructuración. Este tipo de sustratos pueden también inducir procesos de diferenciación de una línea celular a otra tal y como probaron Kim y colaboradores,¹⁴⁶ que cultivaron células madre embrionarias humanas en sustratos de poliuretano reticulado por fotopolimerización radicalaria de acrilatos. Estos estudios revelaron un mayor grado de diferenciación de estas células en células neuronales, con morfología alargada, en sustratos con una topografía formada por líneas de unos 350 nm de anchura que en sustratos planos.

Se ha observado también influencia de la topografía en superficies con salientes en forma de columna o pilar periódicamente distribuidos en la escala micro o nanométrica. Por ejemplo, en superficies de PEG con pilares salientes (también de PEG) de unos 100 nm de anchura y separados por distancias inferiores a la micra, se observó una buena adhesión celular, comportamiento que no se observa en sustratos

¹⁴⁴ He, W., Halberstadt, C.R., Gonsalves, K.E. *Biomaterials*, **2004**, *25*, 2055-2063.

¹⁴⁵ Kim, D.H., Han, K., Gupta, K., Kwon, K.W., Suh, K.Y., Levchenko, A. *Biomaterials*, **2009**, *30*, 5433-5444.

¹⁴⁶ Lee, M.R., Kwon, K.W., Jung, H., Kim, H.N., Suh, K., Kim, K., Kim, K.S. *Biomaterials*, **2010**, *31*, 4360-4366.

planos de PEG debido a la hidrofilia del polímero.¹⁴⁷ Esto indica que las propiedades superficiales del material pueden verse modificadas mediante una distribución adecuada de los pilares en este tipo de estructuras, un parámetro que puede controlarse mediante fotolitografía o UV-NIL tal y como se ha comentado anteriormente. Este hecho se puede utilizar para modular la adhesión de las células en las distintas zonas del material y obtener así una migración controlada hacia las zonas donde las células muestran una mejor adhesión.¹⁴⁸

1.3.2. FOTOPOLIMERIZACIÓN POR REACCIÓN DE TIOL-ENOS EN BIOMATERIALES

Como se ha visto en el apartado 1.2.1.1, la fotopolimerización por adición de tioles a dobles enlaces (tiol-enos) presenta algunas ventajas sobre la fotopolimerización de acrilatos, como la formación de redes más homogéneas, lo que ha llevado a investigar esta reacción como alternativa en la reparación de defectos en piezas dentales.^{149, 150} Derivados acrílicos como el 2,2-bis[4-(2-hidroxi-3-metacrililoiloxipropiloxi)fenil]propano (bisGMA) (figura 15.a) y el dimetacrilato de trietilenglicol (TEGDMA) (figura 15.b), utilizados también en resinas acrílicas con esta misma aplicación,³⁴ pueden ser reticulados por medio de tioles multifuncionales como el tetra(3-mercaptopropionato) de pentaeritritoilo (PETMP) (figura 15.c). Estos procesos de fotopolimerización dan lugar a la formación de redes con menores tensiones

¹⁴⁷ Kim, P., Kim, D.H., Kim, B., Choi, S.K., Lee, S.H., Khademhosseini, A., Langer, R., Suh, K.Y. *Nanotechnology*, **2005**, *16*, 1-7.

¹⁴⁸ Kim, D.H., Seo, C.H., Han, K., Kwon, K.W., Levchenko, A., Suh, K.Y. *Adv. Funct. Mater.*, **2009**, *19*, 1579-1586.

¹⁴⁹ Cramer, N.B., Couch, C.L., Schreck, K.M., Carioscia, J.A., Boulden, J.E., Stansbury, J.W., Bowman, C.N. *Dent. Mater.*, **2010**, *26*, 21-28.

¹⁵⁰ Cramer, N.B., Couch, C.L., Schreck, K.M., Boulden, J.E., Wydra, R., Stansbury, J.W., Bowman, C.N. *Dent. Mater.*, **2010**, *26*, 799-806.

mecánicas que sus homólogos basados únicamente en acrilatos a la vez que mantienen unas propiedades mecánicas similares.¹⁵⁰

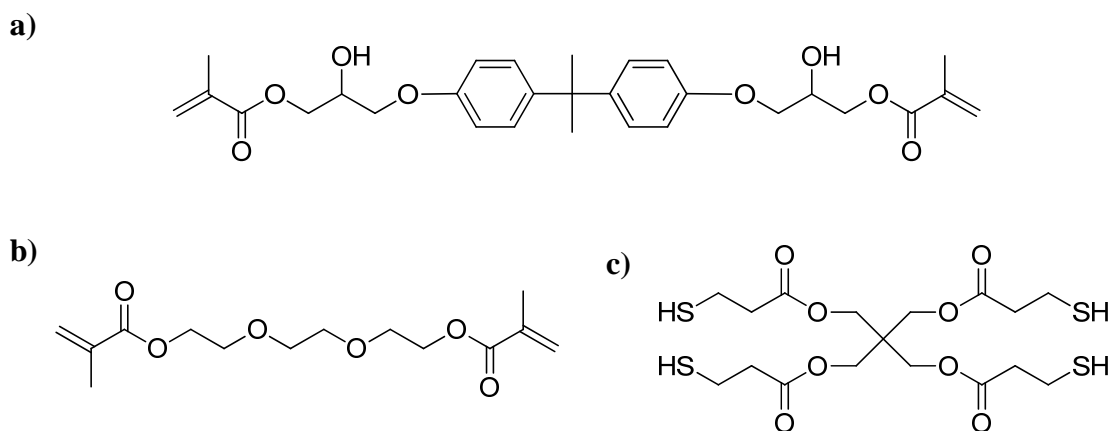


Fig. 15. Estructuras químicas del bisGMA (a), TEGDMA (b) y del PETMP (c), utilizados para relleno de piezas dentales por fotopolimerización de tiol-enos.

Otra ventaja de estos procesos de fotopolimerización es que se evita la formación de cadenas carbonadas no biodegradables como ocurre en la polimerización de acrilatos (figura 16). De esta forma, si se utiliza un polímero degradable funcionalizado con dobles enlaces, y un reticulante de bajo peso molecular, la degradación de la red polimérica puede dar lugar a productos de bajo peso molecular (figura 16.b). Esta característica resulta interesante en algunas aplicaciones biomédicas como la Ingeniería de Tejidos o la liberación controlada de fármacos en los que se requiere una biodegradación *in vivo*, y que los productos resultantes no sean tóxicos y fácilmente excretables.

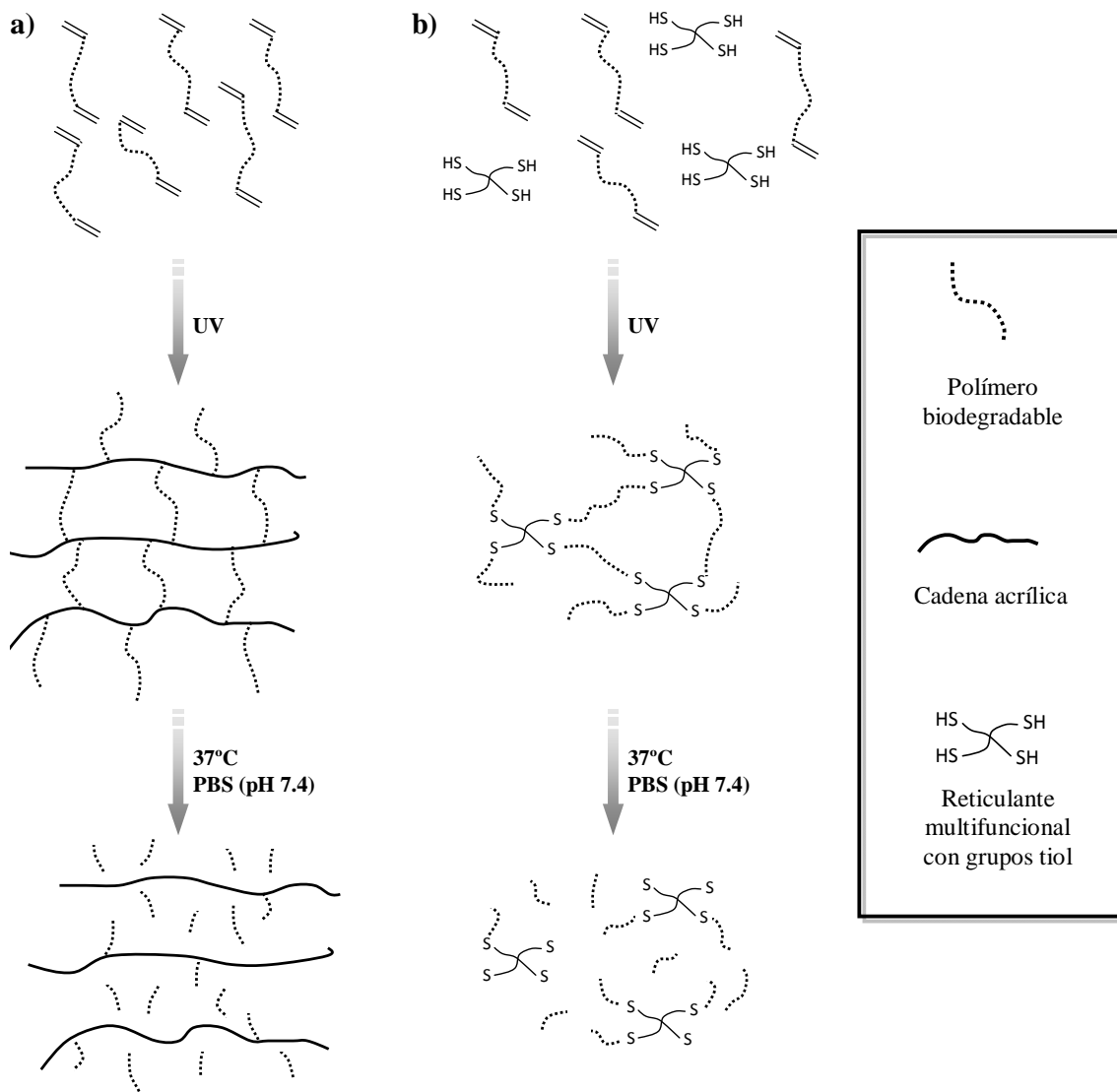


Fig. 16. Esquema de la degradación de una red polimérica generada por fotopolimerización radicalaria de acrilatos (a) y por fotopolimerización de tiol-enos (b).

Los estudios llevados a cabo sobre sistemas tiol-eno han permitido conocer la influencia de la composición y las condiciones de fotopolimerización en las propiedades.^{151, 152, 153} En el ámbito de los biomateriales se han estudiado

¹⁵¹ Rydholm, A.E., Bowman, C.N., Anseth, K.S. *Biomaterials*, **2005**, 26, 4495-4506.

¹⁵² Reddy, S.K., Anseth, K.S., Bowman, C.N. *Polymer*, **2005**, 46, 4212-4222.

¹⁵³ Rydholm, A.E., Reddy, S.K., Anseth, K.S., Bowman, C.N. *Polymer*, **2007**, 48, 4589-4600.

fundamentalmente sistemas basados en PEG y polímeros naturales tal y como se va a comentar a continuación.

Entre estos estudios se encuentran los llevados a cabo por Anseth y colaboradores (grupo de referencia en este tipo de materiales) que se centran principalmente en copolímeros bloque de polihidroxialcanoatos y PEG funcionalizados con dobles enlaces (figura 17.a) que se entrecruzan con reticulantes tiolados multifuncionales (figuras 17.c y 17.d). De esta forma se consiguen materiales biodegradables en los que se pueden modificar las propiedades del material controlando la composición de la mezcla fotopolimerizable. Por ejemplo la utilización del reticulante tiolado multifuncional en defecto lleva a un proceso de polimerización mixto de acrilatos / tiol-enos.^{151, 152} Este proceso de fotopolimerización mixto hace que se generen cadenas acrílicas no biodegradables que ralentizan la velocidad de degradación, efecto que también se consigue utilizando un tiol multifuncional sin enlaces hidrolíticamente lábiles (figura 17.f),¹⁵³ o llevando a cabo el proceso en presencia de disolvente, lo que favorece las ciclaciones que limitan también la degradación.¹⁵³ Todos estos parámetros (estequiometría, naturaleza del reticulante, concentración de las especies reactivas...) proporcionan una gran versatilidad para obtener redes poliméricas con propiedades definidas y modulables.

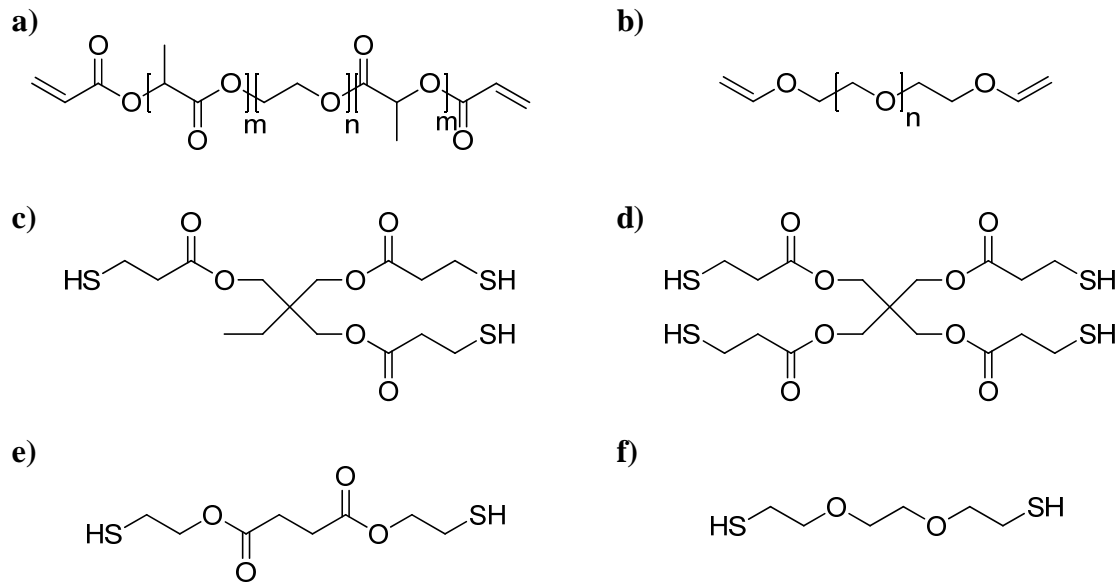


Fig. 17. Estructura química de los polímeros con dobles enlaces (a, b) y de los tioles multifuncionales (c, d, e, f) utilizados por el grupo de Anseth para estudiar la degradabilidad de las redes poliméricas generadas por fotopolimerización de tiol-enos.^{151, 153}

Respecto a las aplicaciones biomédicas, se ha estudiado el uso de estas redes de PEG como sistemas transportadores de células para terapia celular debido a la biocompatibilidad del PEG. Con este fin, se ha descrito la funcionalización del PEG con dobles enlaces (grupos acrilato o grupos fumarato) para su reticulación utilizando una cadena de PEG con grupos tiol en sus extremos.¹⁵⁴

Se ha estudiado la biofuncionalización de estos materiales con biomoléculas para favorecer la adhesión celular. Para ello se han utilizado péptidos con grupos cisteína (que contienen grupos tiol) que actúan como reticulante de los polímeros de PEG con dobles enlaces (figura 18). Estos materiales, gracias a la bioactividad del reticulante peptídico, pueden favorecer determinados procesos biológicos como la

¹⁵⁴ Brink, K.S., Yang, P.J., Temenoff, J.S. *Acta Biomater.*, **2009**, 5, 570-579.

diferenciación celular,^{155, 156, 157, 158, 159} o la actividad de un determinado tipo de células funcionales como las pancreáticas.^{160, 161} Esta estrategia de reticular un polímero como el PEG con péptidos puede ser utilizada también en liberación controlada de fármacos. Se ha descrito por ejemplo la reticulación del PEG con un péptido que es reconocido específicamente por una enzima para que la carga sea liberada solamente en presencia de dicha enzima.¹⁶²

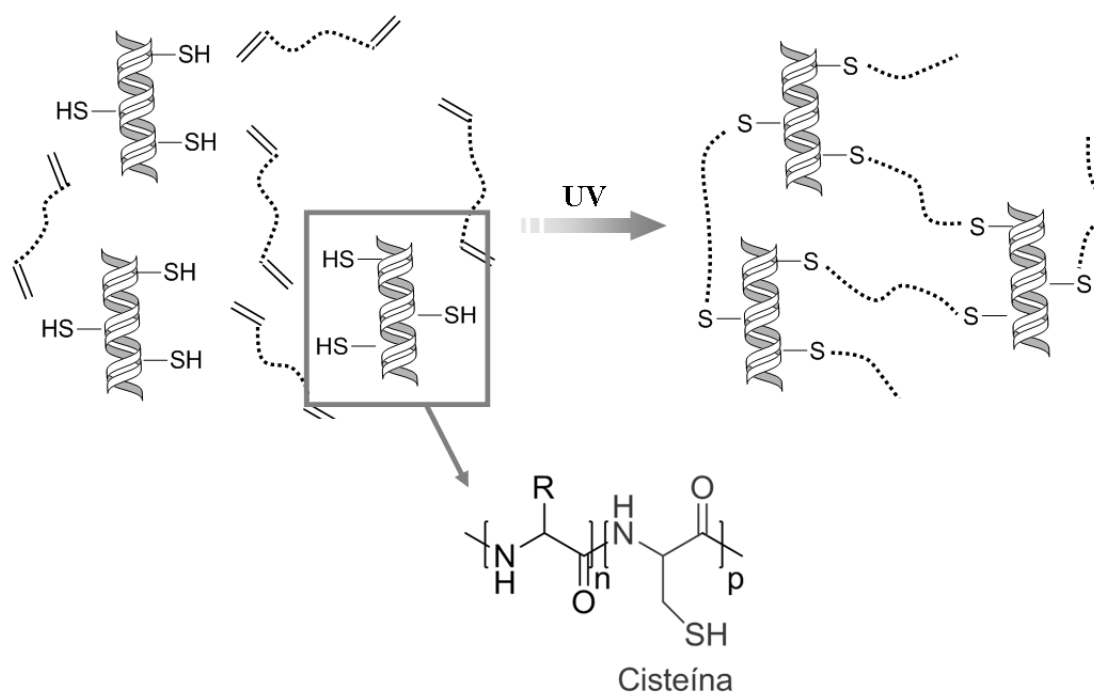


Fig. 18. Esquema de la fotorreticulación de un polímero biodegradable funcionalizado con dobles enlaces mediante química de tior-enos utilizando un péptido con grupos cisteína como agente reticulante.

¹⁵⁵ Salinas, C.N., Cole, B.B., Kasko, A.M., Anseth, K.S. *Tissue Eng.*, **2007**, *13*, 1025-1034.

¹⁵⁶ Salinas, C.N., Anseth, K.S. *Biomaterials*, **2008**, *29*, 2370-2377.

¹⁵⁷ Cushing, M.C., Liao, J.T., Jaeggli, M.P., Anseth, K.S. *Biomaterials*, **2007**, *28*, 3378-3387.

¹⁵⁸ Salinas, C.N., Anseth, K.S. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2009**, *90*, 456-464.

¹⁵⁹ Anderson, S.B., Lin, C.C., Kuntzler, D.V., Anseth, K.S. *Biomaterials*, **2011**, *32*, 3564-3574.

¹⁶⁰ Lin, C.C., Anseth, K.S. *Biomacromolecules*, **2009**, *10*, 2460-2467.

¹⁶¹ Lin, C.C., Anseth, K.S. *PNAS*, **2011**, *108*, 6380-6385.

¹⁶² Aimetti, A.A., Machen, A.J., Anseth, K.S. *Biomaterials*, **2009**, *30*, 6048-6054.

La utilización de la reacción de tiol-enos para la reticulación de polímeros naturales funcionalizados con dobles enlaces ha sido explorada en el caso de la heparina. En este estudio se llevó a cabo la fotopolimerización conjunta de PEG y heparina, ambos polímeros funcionalizados con grupos acrilato, utilizando como reticulante un poliéster alifático funcionalizado con derivados del ácido maleico y con grupos tiol.¹⁶³ Estos estudios revelan una mayor degradación del material formado por química de tiol-enos (reticulante con grupos tiol) que por fotopolimerización radicalaria de acrilatos (reticulante con derivados de ácido maleico), mientras que la presencia de la heparina favorece la proliferación celular en tejidos vasculares. Se han llevado a cabo también algunos estudios con ácido hialurónico funcionalizado con grupos acrilato y reticulado con PEG^{164, 165, 166, 167} o con péptidos¹⁶⁸ que contienen grupos tiol, si bien estos materiales fueron preparados entrecruzando el polímero por un mecanismo de adición de Michael en el que el tiol reacciona con el grupo acrilato sin necesidad de luz.

Al igual que sucede en la polimerización radicalaria de acrilatos, la adición de determinados compuestos a la mezcla polimerizable de tiol-enos (fotoinducida o por adición de Michael) permite la encapsulación de los mismos en el interior de la matriz polimérica. De esta forma se ha estudiado la introducción de biomoléculas como factores de crecimiento en estos andamiajes para favorecer la proliferación celular.¹⁶⁹ Esta estrategia se puede llevar a cabo también en presencia de células para obtener redes

¹⁶³ Pedrón, S., Peinado, C., Bosch, P., Anseth, K.S. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 4189-1498.

¹⁶⁴ Ji, Y., Ghosh, K., Shu, X.Z., Li, B., Sokolov, J.C., Prestwich, G.D., Clark, R.A.F., Rafailovich, M.H. *Biomaterials*, **2006**, *27*, 3782-3792.

¹⁶⁵ Shu, X.Z., Liu, Y., Palumbo, F.S., Luo, Y., Prestwich, G.D. *Biomaterials*, **2004**, *25*, 1339-1348.

¹⁶⁶ Shu, X.Z., Ahmad, S., Liu, Y., Prestwich, G.D. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2006**, *79*, 902-912.

¹⁶⁷ Kim, J., Park, Y., Tae, G., Lee, K.B., Hwang, C.M., Hwang, S.J., Kim, I.S., Noh, I., Sun, K. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2009**, *88*, 967-975.

¹⁶⁸ Lei, Y., Gojgini, S., Lam, J., Segura, T. *Biomaterials*, **2011**, *32*, 39-47.

¹⁶⁹ Peattie, R.A., Rieke, E.R., Hewett, E.M., Fisher, R.J., Shu, X.Z., Prestwich, G.D. *Biomaterials*, **2006**, *27*, 1868-1875.

poliméricas con las células alojadas en su interior ya sea por irradiación con luz UV¹⁵⁹ o por el mecanismo de adición de Michael.¹⁶⁵

El proceso fotoinducido de tiol-enos, al estar iniciado por la luz, también permite aplicar técnicas de estructuración como las descritas en el apartado 1.2.2 de este capítulo. Así lo demostraron Hawker y colaboradores que aplicaron la técnica de UV-NIL para preparar materiales con una superficie microestructurada a partir de resinas fotopolimerizables con monómeros multifuncionales con grupos acrilato y grupos tiol (algunos de ellos derivados del PEG).¹⁷⁰ No obstante, este tipo de estructuras no se han utilizado todavía como soporte para el cultivo celular.

Gracias a algunas de sus características (típicas de los procesos de *click chemistry*) como la rapidez, la ortogonalidad con la mayoría de grupos funcionales o la posibilidad de llevarlas a cabo a temperatura ambiente, la química de tiol-enos (y la química de tiol-inos pueden ser utilizadas para funcionalizar la superficie de un material. Este proceso puede realizarse de forma selectiva en determinadas zonas del material mediante las técnicas de estructuración descritas en apartados anteriores,^{171, 172} lo que permite además anclar selectivamente moléculas que influyan en la respuesta celular (estudios celulares que no se han llevado a cabo hasta la fecha en este tipo de sustratos selectivamente funcionalizadas).

¹⁷⁰ Campos, L.M., Meinel, I., Guino, R.G., Schierhorn, M., Gupta, N., Stucky, G.D., Hawker, C.J. *Adv. Mater.*, **2008**, *20*, 3728-3733.

¹⁷¹ Jonkheijm, P., Weinrich, D., Köhn, M., Engelkamp, H., Christianen, P.C.M., Kuhlmann, J., Maan, J.C., Nüsse, D., Schroeder, H., Wacker, R., Breinbauer, R., Niemeyer, C.M., Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 4421-4424.

¹⁷² Wendeln, C., Rinnen, S., Schulz, C., Arlinghaus, H.F., Ravoo, B.J. *Langmuir*, **2010**, *20*, 15966-15971.

En este capítulo se ha hecho una introducción a distintas aplicaciones biomédicas y a la utilización de polímeros para estas aplicaciones. Se ha prestado especial atención a los fotopolímeros obtenidos por polimerización radicalaria de acrilatos y química de tiol-enos por ser antecedentes directos de los materiales estudiados en esta tesis, los cuales han sido preparados por reacciones fotoinducidas, como la fotodescomposición de sales de diazonio y la química de tiol-inos. Estos dos tipos de reacción no se habían utilizado como soportes para crecimiento celular y no existen referencias previas en la bibliografía (salvo las derivadas de esta tesis doctoral).

2. OBJETIVOS

Como se ha visto en el capítulo de Antecedentes, las reacciones de fotopolimerización son una herramienta interesante en la preparación de biomateriales ya que pueden realizarse a temperatura ambiente, de forma eficiente y permiten modular las propiedades de una forma sencilla. Estas reacciones permiten además estructurar el material lo que permite diseñar su topografía e influir así en los procesos celulares, tal y como se ha comentado anteriormente.

Dentro de este tipo de procesos, las reacciones de fotopolimerización por reacción de dos grupos funcionales (como la de tiol-enos) permiten la obtención de materiales que pueden ser totalmente degradados, lo que supone una ventaja respecto a la fotopolimerización radicalaria de acrilatos, que es la técnica más utilizada hasta el momento.

El objetivo general de esta tesis doctoral es el estudio de dos reacciones de fotopolimerización alternativas a la fotopolimerización de acrilatos, la reacción fotoiniciada de tiol-inos y la fotodescomposición de las sales de diazonio, para la fabricación de estructuras poliméricas con geometría controlada que pueden ser útiles como soportes para el cultivo de células. Este tipo de reacciones no habían sido estudiadas previamente en este campo de biomateriales hasta el comienzo de esta tesis doctoral, y se pretende estudiar su potencial como alternativa a los fotopolímeros convencionales en la preparación de biomateriales.

2.1. SALES DE DIAZONIO

Respecto a la reacción de fotodescomposición de sales de diazonio se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- i) Síntesis de un nuevo reticulante de bajo peso molecular basado en sales de diazonio para evitar el uso de las sales de diazonio poliméricas no degradables utilizadas hasta el momento.
- ii) Estudio de la reacción de fotorreticulación con polímeros modelo para verificar la viabilidad de la estructuración con luz de películas poliméricas mediante la fotodescomposición de sales de diazonio.
- iii) Estudio de la fotorreticulación de biopolímeros y polímeros biodegradables sintéticos para la generación de soportes para cultivo celular.
- iv) Estudio de la biocompatibilidad de los materiales generados.
- v) Microestructuración con luz de los fotopolímeros.
- vi) Estudio de la influencia de la topografía en la adhesión y proliferación celular.

Los estudios asociados a estos objetivos específicos se describen en los capítulos 3, 4 y 5 de esta memoria. El *capítulo 3* recoge los resultados correspondientes a los polímeros modelo, estudio de la reacción y la posibilidad de microestructuración. Los *capítulos 4 y 5* recogen los estudios realizados con fotopolímeros basados en polímeros naturales y sintéticos respectivamente, que incluyen los estudios de viabilidad celular, la microestructuración del material y el estudio de la influencia de la microestructura en el crecimiento celular.

2.2. TIOL-INOS

Para el estudio de la reacción fotoinducida de tiol-inos, cuyos resultados se recogen en el *capítulo 6* de esta tesis, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- i) Síntesis de nuevos polímeros con grupos alquino terminales para la preparación de formulaciones fotorreticulables por química de tiol-inos.
- ii) Preparación de materiales con distinto grado de reticulación.
- iii) Estudio del proceso de fotorreticulación y caracterización de los materiales obtenidos con distinto grado de reticulación.
- iv) Estudio de la biocompatibilidad de los materiales obtenidos con distinto grado de reticulación.
- v) Microestructuración con luz de los fotopolímeros.
- vi) Estudio de la influencia de la topografía en la adhesión y proliferación celular.

3. FOTORRETICULACIÓN DE POLÍMEROS MODELO CON UNA SAL DE DIAZONIO TRIFUNCIONAL

(parte de los resultados de este capítulo han sido publicados en las revistas European Polymer Journal, 2009, Vol. 45, p. 1785-1790 y Carbohydrate Polymers, 2012, Vol. 90, p. 419-430)

3.1. INTRODUCCIÓN

La descomposición fotoinducida de los grupos diazonio permite la fotorreticulación de polímeros que contengan, por ejemplo, grupos hidroxilo,¹ sulfonato,² carboxilato³ o fosfato.^{4, 5} Hasta la fecha este proceso de reticulación se ha llevado a cabo principalmente con una sal de diazonio polimérica (figura 1) cuya estructura no está del todo definida (véase apartado 1.2.1.2). Se ha estudiado el uso de estos materiales como fotorresinas para aplicaciones de litografía^{2, 6, 7, 8} y en la fabricación de sistemas electroópticos.^{3, 9, 10, 11, 12} Esta sal de diazonio polimérica se ha utilizado también en otras aplicaciones como la implementación de biosensores por reticulación de DNA,^{4, 5} o la encapsulación de enzimas en vesículas de poliestirensulfonato (PSS),¹³ si bien no se ha descrito su uso para la preparación de sustratos o andamiajes para el crecimiento de células o ingeniería de tejidos.

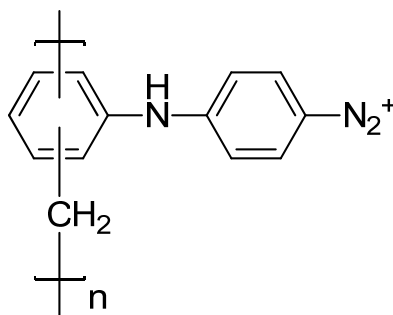


Fig. 1. Estructura química de la sal de diazonio polimérica utilizada para fotorreticulación.

¹ Chen, J., Cao, W. *Chem. Commun.*, **1999**, 1711-1712.

² Cao, W., Ye, S., Cao, S., Zhao, C. *Macromol. Rapid Commun.*, **1997**, *18*, 983-989.

³ Cao, T., Yang, S., Cao, J., Zhang, M., Huang, C., Cao, W. *J. Phys. Chem. B*, **2001**, *105*, 11941-11944.

⁴ Yu, B., Cong, H.L., Liu, H.W., Lu, C.H., Wei, F., Cao, W. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2006**, *384*, 385-390.

⁵ Li, Q., Ouyang, J., Chen, J., Zhao, X., Cao, W. *J. Polym. Sci. A*, **2002**, *40*, 222-228.

⁶ Luo, H., Yang, B., Yang, L., Cao, W. *Macromol. Rapid Commun.*, **1998**, *19*, 291-294.

⁷ Zhang, Y., Cao, W. *J. Polym. Sci. A*, **2000**, *38*, 2566-2571.

⁸ Liu, J.H., Lee, S.Y., Tsai, F.R. *J. Appl. Polym. Sci.*, **1998**, *70*, 2401-2407.

⁹ Zhao, S., Zhang, K., Yang, M., Sun, Y., Sun, C. *Mater. Lett.*, **2006**, *60*, 2406-2409.

¹⁰ Cao, T., Yang, S., Yang, Y., Huang, C., Cao, W. *Langmuir*, **2001**, *17*, 6034-6036.

¹¹ Cao, T., Wei, L., Yang, S., Zhang, M., Huang, C., Cao, W. *Langmuir*, **2002**, *18*, 750-753.

¹² Zhang, L., Peng, Z., Yao, L., Lv, F., Xuan, L. *J. Mater. Chem.*, **2007**, *17*, 3015-3022.

¹³ Srivastava, R., Brown, J.Q., Zhu, H., McShane, J. *Biotechnol. Bioeng.*, **2005**, *91*, 124-131.

Esta reacción presenta una serie de características que la convierten en una estrategia interesante para la preparación de biomateriales. En primer lugar, al ser un proceso de fotorreticulación que implica dos grupos funcionales, es posible evitar la formación de cadenas carbonadas largas no biodegradables, como sucede en la polimerización de acrilatos, que podrían llegar a acumularse en el organismo. Además, es un proceso que no requiere fotoiniciador, que podría (él o alguno de los subproductos generados) generar una respuesta inflamatoria.¹⁴ Su reactividad con grupos nucleófilos, presentes en muchos polímeros utilizados en biomateriales como es el caso de los polisacáridos constituye una oportunidad para la preparación de biomateriales, ya que estos polímeros podrían ser reticulados sin necesidad de modificación química alguna. La naturaleza iónica de los grupos diazonio hace que el proceso de reticulación pueda tener lugar en medio acuoso en donde, además, se favorece la reacción por interacción electrostática^{6, 15} o mediante puentes de hidrógeno^{1, 9} entre los grupos reactivos. Esto supone evitar el uso de disolventes orgánicos e implica polímeros a fotorreticular que sean solubles en agua.

Para la utilización de esta reacción en la preparación de biomateriales es recomendable la utilización de una sal de diazonio multifuncional de bajo peso molecular, en lugar de los derivados oligoméricos empleados habitualmente. De esta forma se evita la formación de residuos de cadena larga y se reduce el riesgo de acumulación en el organismo. Sin embargo, hasta la fecha sólo se ha descrito la utilización de una sal de diazonio de bajo peso molecular como reticulante.¹⁶ Este reticulante, preparado por Cao y colaboradores, es un derivado de bifenilo con dos

¹⁴ Fridovich, I. *J. Exp. Biol.*, **1998**, *201*, 1203-1209.

¹⁵ Chen, J., Luo, H., Cao, W. *Polym. Int.*, **2000**, *49*, 382-386.

¹⁶ Cao, W., Cui, P., Wang, R. *J. Imag. Sci. Technol.*, **2000**, *44*, 174-176.

grupos diazonio (figura 2) que se utilizó para la preparación de fotorresinas mediante reticulación de PSS por vía térmica y fotoquímica.

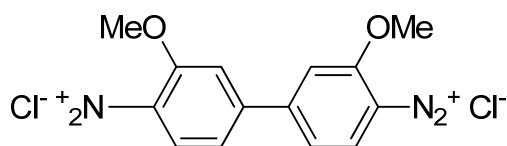
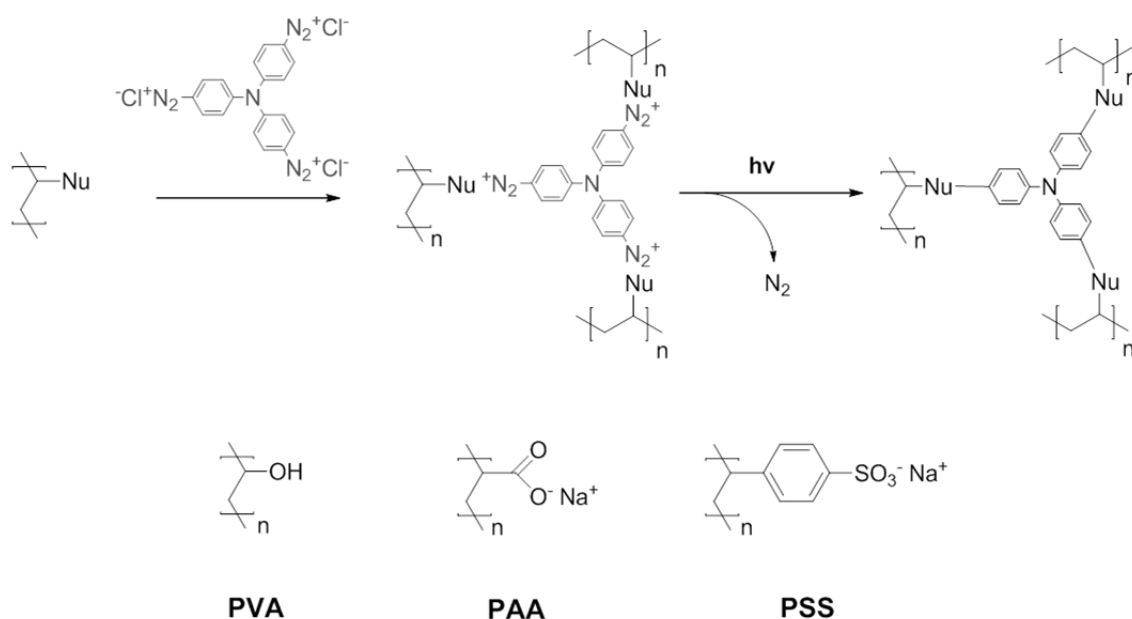


Fig. 2. Estructura química de la sal de diazonio bifuncional utilizada para reticular PSS.¹⁶

En este capítulo se describe la síntesis de un nuevo reticulante trifuncional de bajo peso molecular, el cloruro de N,N,N-tris((4-diazofenil)amina), que se va a utilizar para el entrecruzamiento de diversos polímeros modelo como el poliestirensulfonato de sodio (PSS), el poliacrilato de sodio (PAA) o el polivinil alcohol (PVA), que contienen diferentes grupos nucleófilos como son el grupo sulfonato, carboxilato e hidroxilo respectivamente (esquema 1). Para ello llevará a cabo la preparación de películas fotorreticulables por la técnica de *spin coating* y se caracterizará el proceso de irradiación por técnicas espectroscópicas. Se estudiará también la posibilidad de aplicar técnicas de microestructuración con luz como la fotolitografía para generar estructuras poliméricas de geometría controlada.



Esquema 1. Reticulación de un polímero con grupos nucleófilos mediante fotodescomposición del reticulante objetivo de este capítulo.

3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2.1. SÍNTESIS DEL RETICULANTE

La sal de diazonio trifuncional utilizada como reticulante se sintetizó por diazotización de la N,N,N-tri(4-aminofenil)amina. Esta fue seleccionada como precursor porque el átomo de N central mejora la estabilidad de los grupos diazonio.¹⁷ La reacción de diazotización se realiza con nitrito de sodio (NaNO₂) en medio ácido y a cero grados. Una vez formada la sal de diazonio trifuncional, ésta se aísla para su caracterización por ¹H-RMN y espectroscopias IR y UV-Vis mediante precipitación de un complejo con ZnCl₂ a partir de la disolución acuosa, según un procedimiento previamente descrito.¹⁷

¹⁷ Cao, S., Zhao, C., Cao, W. *Polym. Int.*, **1998**, 45, 142-146.

En la figura 3 se muestran los espectros de ^1H -RMN tanto del precursor (debajo) como del complejo con ZnCl_2 de la sal de diazonio obtenida. Tras la reacción de diazotización, el espectro de la sal de diazonio trifuncional en agua deuterada (figura 3, arriba) no revela la señal a 4.30 ppm de los grupos amino. A su vez, los H aromáticos más próximos al N central aparecen como un doblete a 7.78 ppm mientras que los H más próximos a los grupos diazonio aparecen como un doblete a 8.60 (con una constante de acoplamiento de 9 Hz) y ambos desplazados a campos bajos con respecto a la anilina precursora.

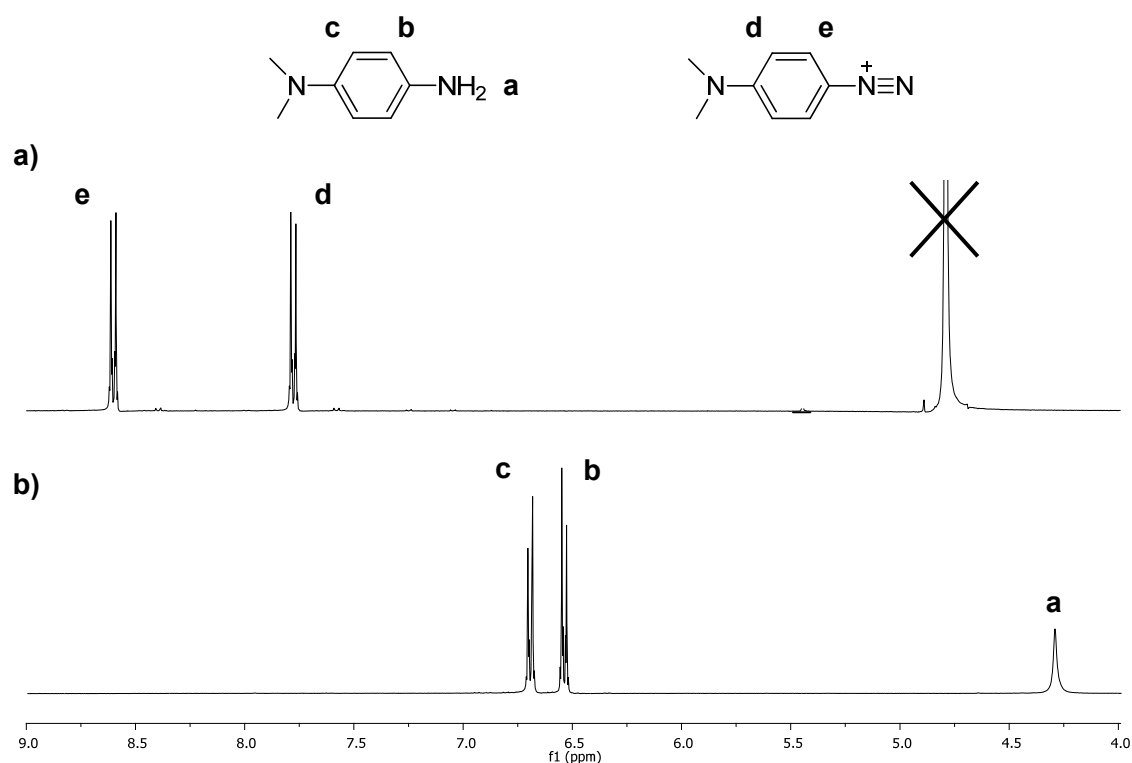


Fig. 3. Espectros de ^1H -RMN de la sal de diazonio trifuncional $\text{N}(\text{PhN}_2^+)_3$ precipitada como un complejo con ZnCl_2 (arriba, disolvente D_2O) y del precursor de trifenilamina como referencia (debajo, disolvente acetona deuterada).

En el espectro de IR (figura 4) de este reticulante puede verse una banda a 2252 cm^{-1} que es debida a la tensión del enlace $\text{N}\equiv\text{N}$ de los grupos diazonio y que corrobora la formación de la sal de acuerdo a lo observado por $^1\text{H-RMN}$.^{9, 18} También se observa una banda a 1556 cm^{-1} que se atribuye a la vibración de los anillos aromáticos conjugados con los grupos diazonio.⁹ En la zona de la huella dactilar pueden verse otras bandas en la zona de 1290-1330 que se atribuyen a los enlaces C-N que unen el anillo aromático al grupo diazonio y al N central.

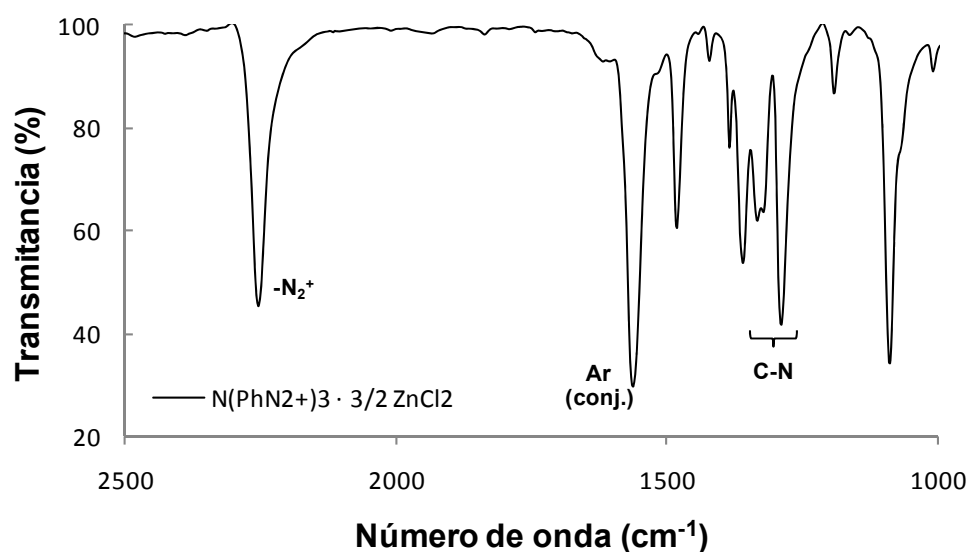


Fig. 4. Espectro IR de la sal de diazonio trifuncional $\text{N}(\text{PhN}_2^+)_3$ precipitada como un complejo con ZnCl_2 .

La formación de la sal de diazonio también modifica el espectro electrónico del reactivo de partida. Así, el reticulante presenta una banda de absorción en el UV-Vis, que en disolución acuosa aparece a 428 nm (figura 5). Esta banda está asociada a la transición $\pi\text{-}\pi^*$ de los grupos diazonio.^{9, 18}

¹⁸ Sun, J., Wu, T., Sun, Y., Wang, Z., Zhang, X., Shen, J., Cao, W. *Chem. Commun.*, **1998**, 1853-1854.

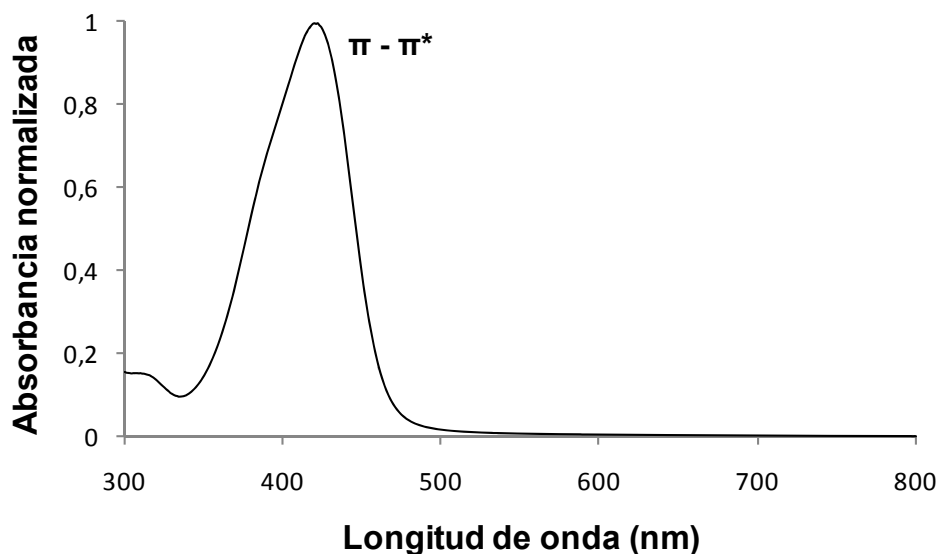


Fig. 5. Espectro de absorción UV-Vis de la sal de diazonio trifuncional en disolución acuosa.

3.2.2. INTERACCIÓN ENTRE EL RETICULANTE Y LOS POLÍMEROS EN DISOLUCIÓN

Es bien sabido que los grupos diazonio pueden interaccionar con los grupos aniónicos de un polímero formando un complejo polielectrolítico (*polyelectrolyte complex* - PEC),^{6, 15} mientras que con los grupos hidroxilo pueden establecer interacciones intermoleculares por enlaces de hidrógeno.^{1,9} Además, estas interacciones estabilizan las sales de diazonio según diversos estudios realizados en este tipo de sistemas.^{6, 15} De acuerdo a estos antecedentes, se realizó un estudio de la interacción entre nuestro reticulante trifuncional de bajo peso molecular y los grupos nucleófilos de los distintos polímeros modelo utilizados.

En el caso del PSS, la adición del polímero sobre el reticulante da lugar a un PEC que precipita cuando la relación de los grupos iónicos se aproxima a la estequiométrica ($-\text{SO}_3^-/-\text{N}_2^+ = 1$) y se redissuelve al añadir exceso de polímero. Esto

permite el seguimiento del proceso de precipitación – redisolución mediante medidas de espectroscopia UV-Vis.

Así, se registró el espectro de UV-Vis a diferentes relaciones $-\text{SO}_3^-/\text{N}_2^+$ y en particular la evolución de la banda a 428 nm al añadir reticulante en disolución (figura 6). Su desaparición indica la precipitación del complejo polielectrolítico y, por consiguiente, la eliminación de la sal de diazonio de la disolución. Una vez alcanzada la relación estequiométrica entre los grupos iónicos ($-\text{SO}_3^-/\text{N}_2^+ = 1$), la adición de un exceso de PSS (ac) lleva a la redisolución del PEC debido a la solvatación de las cargas negativas en exceso. Esto hace que la absorción de la banda a 428 nm en la disolución (tras aplicar una corrección de volumen) vuelva a crecer debido a la redisolución de reticulante en la disolución (figura 6).

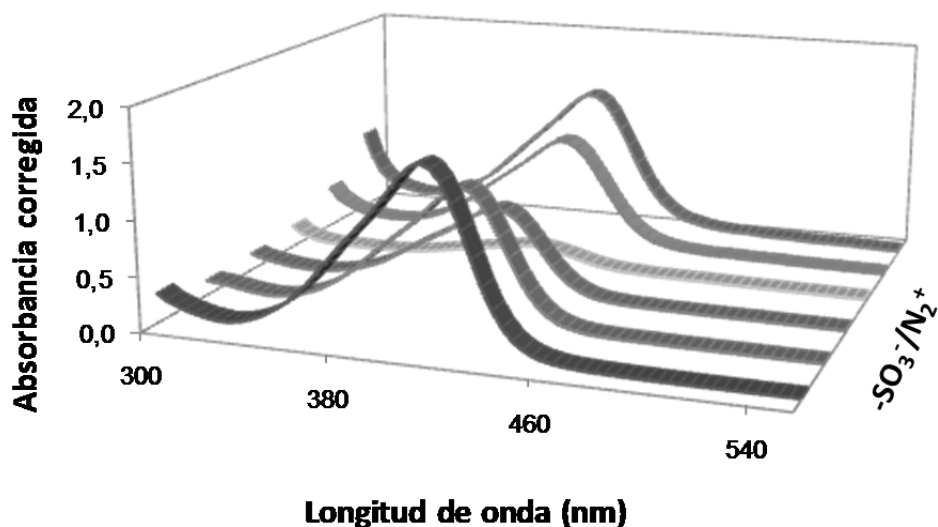


Fig. 6. Espectros de absorción UV-Vis a diferentes relaciones de grupos iónicos ($-\text{SO}_3^-/\text{N}_2^+$) tras aplicar una corrección de volumen a los datos de absorción por el aumento de volumen ocasionado por la adición de agua. Las medidas fueron tomadas a relaciones ($-\text{SO}_3^-/\text{N}_2^+$) de 0, 0,33, 0,66, 1, 2,5 y 5

En el caso del PVA, la baja solubilidad del mismo en agua requiere una gran dilución de la mezcla lo que hace, junto a la débil interacción por enlaces de hidrógeno, que no precipite el complejo formado por la interacción entre ambas especies. Para el PAA sí que se consigue la precipitación del PEC, pero su redisolución en agua al añadir exceso del polímero aniónico es lenta (del orden de horas). Esto lleva a problemas de reproducibilidad, ya que no se pueden trabajar en tiempos largos debido a una posible descomposición de los grupos diazonio.

A partir de los resultados obtenidos para el PSS se seleccionó, para la preparación de películas fotorreticulables de PSS, una relación de grupos $-\text{SO}_3^-/\text{N}_2^+ = 2$ (27% en peso del reticulante para PSS) ya que con esta composición no se produce la precipitación del PEC. De forma análoga, el porcentaje de reticulante para las mezclas de PAA y PVA se ajustó a un 30% (que supone una relación $-\text{SO}_3^-/\text{N}_2^+$ superior a uno) evitándose igualmente la precipitación del PEC para tener una disolución homogénea a partir de la cual preparar las películas fotorreticulables. La preparación de las disoluciones de estos materiales (codificadas como PSS-27, PAA-30 y PVA-30 respectivamente), se llevó a cabo por adición del reticulante sobre el polímero en disolución. Esto hace que en la disolución haya exceso del polímero aniónico en todo momento por lo que no llega a producirse la precipitación del PEC.

3.2.3. PROCESADO Y ESTABILIDAD TÉRMICA DE LAS PELÍCULAS

Una vez determinadas la composición polímero-reticulante, se prepararon películas por la técnica de depósito conocida como *spin coating* a partir de las disoluciones de polímero con el porcentaje ajustado de reticulante. Tras un estudio

previo se fijaron como condiciones de trabajo en el *spin coater*: un ciclo inicial de 1000 rpm durante 5 s seguido de un ciclo a 3000 rpm durante 100 s. Se midió el espesor de las películas obtenidas para PSS-27 y PAA-30 obteniéndose valores alrededor de 1.5 μm . En el caso del PVA-30, el espesor de las películas obtenidas fue de unos 200 nm debido a que el polímero es menos soluble en disolución acuosa y por lo tanto las disoluciones a partir de las cuales se preparan las películas eran más diluidas (ver sección experimental 3.4)

La observación al microscopio óptico de polarización (figura 7) de estas películas antes de ser irradiadas no reveló indicios de segregación de fase. Las películas de PSS-27 (figura 7.a) y PAA-30 (figura 7.b) muestran una morfología tipo dendrítica que puede tener su origen en un cierto carácter cristalino de la película debido a las interacciones iónicas. En el caso del PVA-30 (figura 7.c), donde el reticulante no puede formar interacciones iónicas con el polímero, no se observa la estructura dendrítica. La textura en estas películas es más homogénea y la superficie es plana y regular, a diferencia de lo observado para el caso del PSS-27 y el PAA-30.

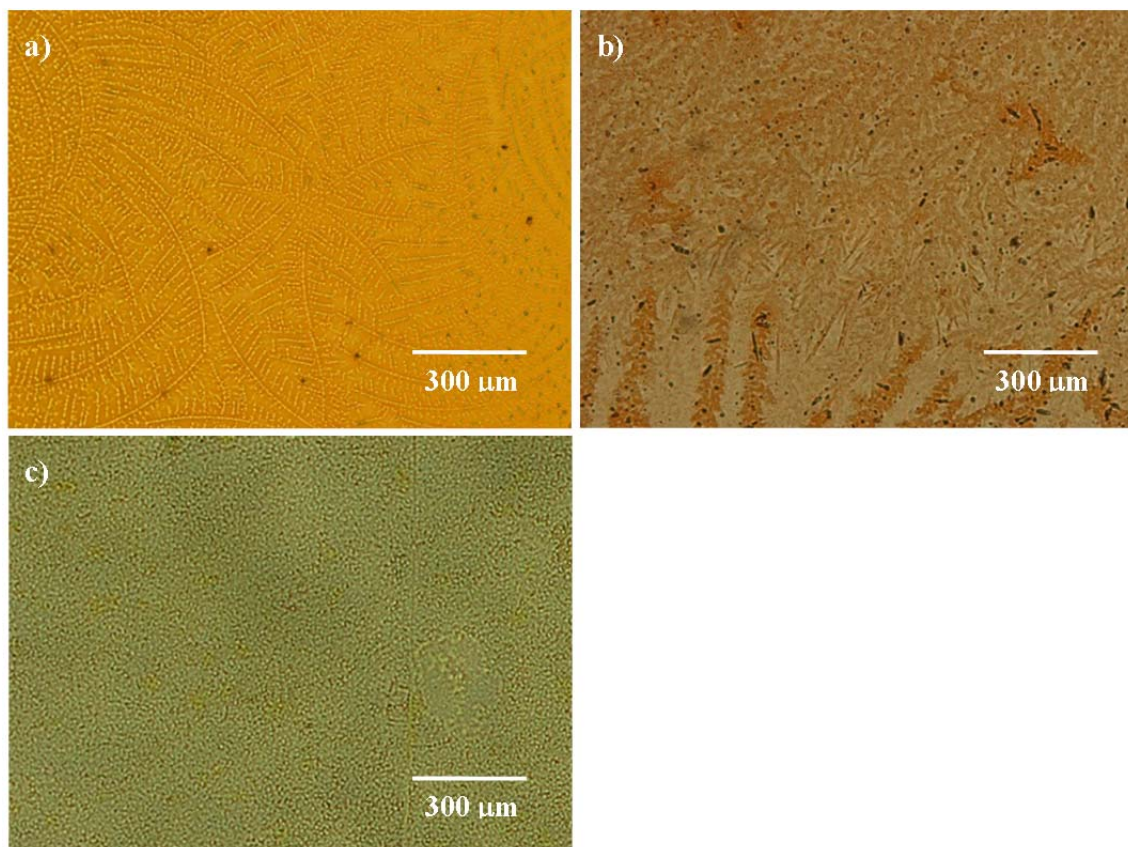


Fig. 7. Fotografías de microscopio óptico de polarización en películas de PSS-27 (a), PAA-30 (b) y PVA-30 (c).

Los grupos diazonio pueden sufrir procesos de descomposición por acción de la luz, pero también por vía térmica. Esto podría dificultar un manejo apropiado de las muestras desde su preparación hasta su irradiación, en la que se produce la descomposición fotoquímica de los grupos diazonio. Se ha descrito en la bibliografía que una interacción iónica, como la que tiene lugar en disolución entre una diazorresina polimérica y un compuesto aniónico, reduce la degradación térmica de los grupos diazonio.⁶ Este tipo de interacción puede tener lugar también en películas (estado sólido) preparadas a partir de disoluciones de la sal de diazonio y polímeros aniónicos, en donde dicha interacción iónica se ve favorecida por la falta de movilidad de las cargas en estado sólido. Sin embargo, no se han descrito estudios para comprobar la estabilidad

en este tipo de películas. Por ello, se llevó a cabo un estudio de la estabilidad térmica de los grupos diazonio tomando las películas fotorreticulables PSS-27 como modelo. El proceso de descomposición de la sal de diazonio se siguió por observación de la banda de absorción correspondiente a la transición π - π^* de los grupos diazonio, que en película presenta el máximo en torno a 424 nm, desplazado respecto al PEC en disolución debido a interacciones en el estado sólido.

En primer lugar se aplicó un tratamiento a una temperatura moderada a una película fotorreticulable de PSS-27. Esta película se calentó durante 15 min a 60°C, no observándose ningún cambio en el espectro de absorción antes y después de aplicar dicho tratamiento térmico (figura 8.a). Esto indica una buena estabilidad térmica de las películas a esta temperatura, muy superior a temperatura ambiente. A continuación se determinó la temperatura a la cual comienzan a descomponer significativamente los grupos diazonio. Para ello se aplicaron sucesivos calentamientos de corta duración y cada vez a mayor temperatura (figura 8.b).

En la figura 8.b puede verse como el calentamiento a temperaturas cercanas a los 90°C comienza a provocar un descenso en la banda a 424 nm lo que se asocia a la descomposición de los grupos diazonio. Sucesivos tratamientos térmicos a temperaturas superiores a los 90°C hicieron disminuir esta banda de absorción hasta cero, lo que indica la completa descomposición de los grupos diazonio a temperaturas superiores a los 160°C. El porcentaje de grupos diazonio descompuesto tras cada uno de los sucesivos tratamientos térmicos puede calcularse a partir de la absorción de la banda a 424 nm (*inset* figura 8.b), según la ecuación:

$$\% \text{ descomposición (mol \%)} = \left(1 - \frac{Aa}{Ao} \right) \times 100 \quad (\text{ec. 1})$$

Donde A_a es la absorbancia medida a 424 nm tras el tratamiento térmico correspondiente y A_o es la absorbancia de la película fotorreticulable a 424 nm justo después de ser preparada y antes de realizar ningún calentamiento. La banda de absorción se normalizan en relación al máximo de absorción de la banda π - π^* de la película inicial, que es la que da un valor de absorbancia más elevado a 424 nm.

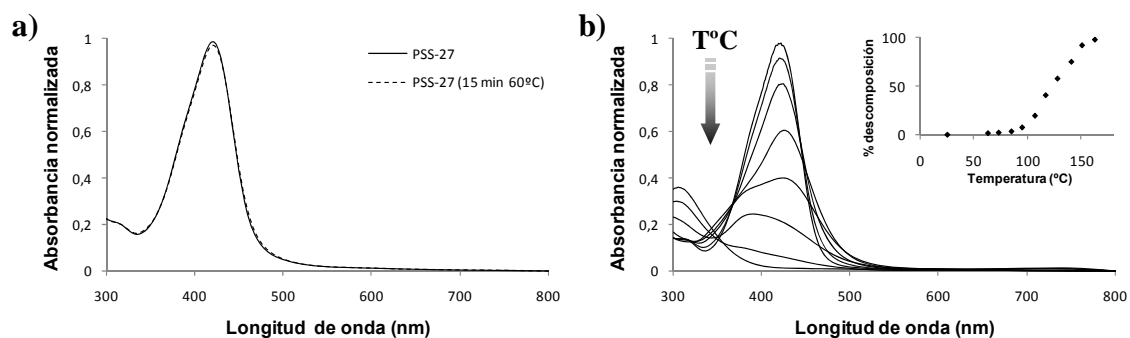


Fig. 8. Espectros de absorción UV-Vis de películas fotorreticulables, sobre sustratos de vidrio, de PSS-27 antes y después de aplicarles un tratamiento térmico a 60°C durante 15 min (a), o sucesivos tratamientos térmicos a temperaturas cada vez más elevadas (b). Estos sucesivos tratamientos térmicos se aplicaron durante 1 min a cada temperatura (véase inset para ver las temperaturas a las que se detecta descomposición)

De este estudio se concluye que las películas, una vez preparadas, tiene cierta estabilidad, no reticulan de forma térmica, y pueden ser manipuladas sin necesidad de extremar las condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente antes de irradiar. En todo caso, para minimizar posibles degradaciones, se trabaja siempre con películas recién preparadas.

3.2.4. FOTORRETICULACIÓN DE LOS POLÍMEROS MODELO

Tras estudiar la interacción de los grupos sulfonato con los grupos diazonio y la estabilidad de las películas fotorreticulables de PSS-27, usadas como referencia, se llevó a cabo la irradiación con luz UV de películas de los tres sistemas modelo para estudiar el proceso de fotorreticulación con polímeros con grupos sulfonato, carboxilato o hidroxilo, mediante espectroscopia UV-Vis e IR.

Como se ha descrito anteriormente, los grupos diazonio muestran una banda de absorción a 428 nm en disolución acuosa que también aparece en las películas fotorreticulables preparadas sobre sustratos de vidrio, en este caso aparece desplazada a menores longitudes de onda, próximas a 424 nm. Cuando estas películas son irradiadas con luz UV de 350-450 nm durante 2 min (ver parte experimental para las condiciones de irradiación), esta señal desaparece en todas las muestras (figura 9), lo que confirma que se produce la descomposición fotoquímica de los grupos diazonio.^{9, 18}

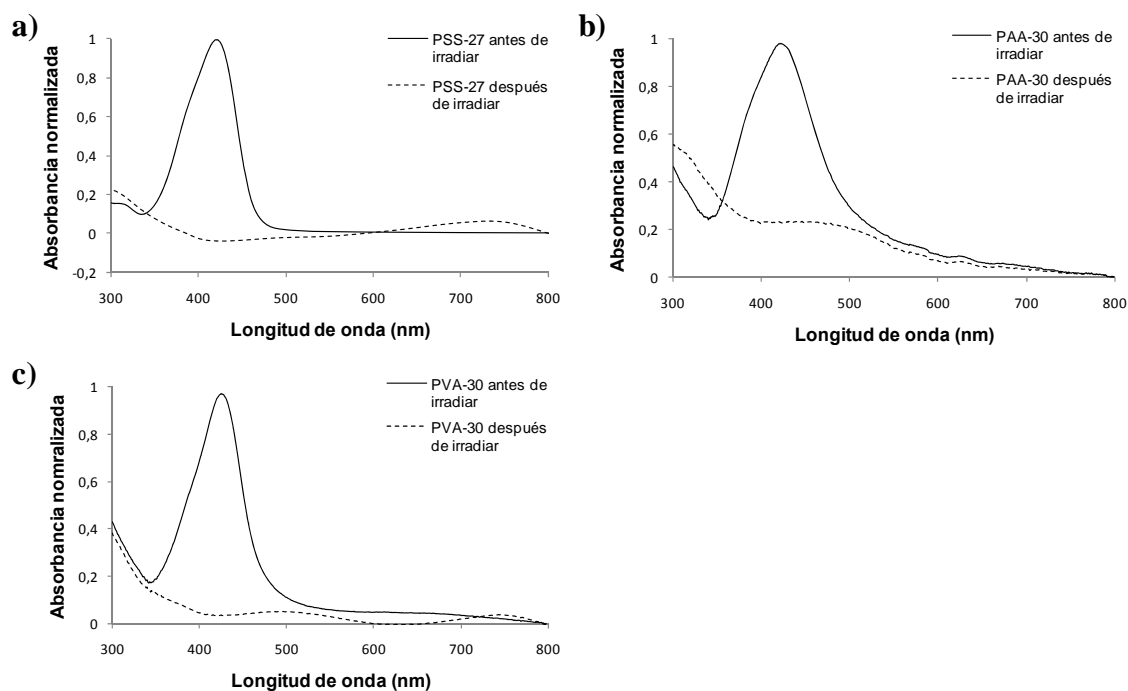


Fig. 9. Espectros de absorción UV-Vis de PSS-27 (a), PAA-30 (b) y PVA-30 (c) antes y después de irradiar con luz UV.

Para estudiar la reacción que se produce como consecuencia de la fotodescomposición, se registraron también los espectros de IR de las películas fotorreticulables antes y después de la irradiación. Se utilizaron las mismas condiciones que para la medida UV-Vis pero en este caso las películas fueron preparadas por *spin coating* sobre sustratos de fluorita (CaF_2). En todos los casos la banda de absorción en torno a 2252 cm^{-1} , debido a la vibración del triple enlace $\text{N}\equiv\text{N}$, desaparece tras la irradiación, lo que demuestra la descomposición fotoinducida de los grupos diazonio. También se puede ver una modificación de la banda sobre 1556 cm^{-1} debida a la vibración de los anillos aromáticos conjugados con los grupos diazonio.⁹ Tras la irradiación con luz UV, se puede ver en las figuras 10.a, 10.c y 10.e como estas bandas se desplazan a mayores números de onda como consecuencia de la pérdida del grupo diazonio y modificación del sustituyente del anillo. En las ampliaciones de las figuras

10.b, 10.d y 10.f pueden verse también dos bandas alrededor de 1328 y 1288 cm^{-1} que se atribuyen a la vibración de los enlaces C-N que unen los anillos aromáticos con los grupos diazonio y con el N central, y que también se ven modificadas tras la irradiación con luz UV.

Respecto a los grupos nucleófilos del polímero, el PSS tiene dos bandas superpuestas a 1215 cm^{-1} (hombro) y 1185 cm^{-1} que se asignan a la vibración del grupo sulfonato (figura 10.b). Tras la irradiación, la primera desaparece mientras que la otra se desplaza a 1176 cm^{-1} y junto con un hombro en 1155 cm^{-1} (figura 10.b). Este desplazamiento a menor número de onda se asocia a la formación del éster sulfónico.¹⁸ Para las películas de PAA-30 se puede ver una banda ancha alrededor de 1660 cm^{-1} (figura 10.c) que se atribuye a la vibración de los enlaces C=O de los grupos carboxilato. Tras la irradiación aparece una banda por encima de 1700 cm^{-1} , que se atribuye a la formación de enlaces éster, y que aparece solapada con la anterior a 1660 cm^{-1} debido a los grupos carboxilato en exceso. Al mismo tiempo, al irradiar también se observa la aparición de una banda ancha en la zona de 1200-1300 cm^{-1} que se atribuye a la fotodescomposición del reticulante y la consiguiente formación de enlaces ésteres, que muestran bandas en esta región del espectro debido a la tensión del enlace C-O (figura 10.d). Las películas de PVA-30 muestran una banda ancha entre 1200 y 1300, que aparece solapada con las bandas de los grupos C-N del reticulante (figura 10.f) y que se atribuye a la vibración de los enlaces C-O de los grupos hidroxilo. Esta banda, junto a las de los grupos C-N del reticulante, se ve modificada tras el proceso de irradiación con luz UV, a la vez que aparece otra banda nueva a 1317 cm^{-1} . Estos cambios se atribuyen a la fotodescomposición del reticulante y la consiguiente formación de grupos éter, que se solapan con los grupos hidroxilo en exceso del PVA.

Además de los cambios espectrales detectados tras el proceso de irradiación, la reticulación del polímero matriz puede detectarse macroscópicamente por un cambio de solubilidad, por ejemplo en una disolución acuosa básica. Las películas dejan de ser solubles una vez irradiadas, lo que confirma la formación de una red entrecruzada.

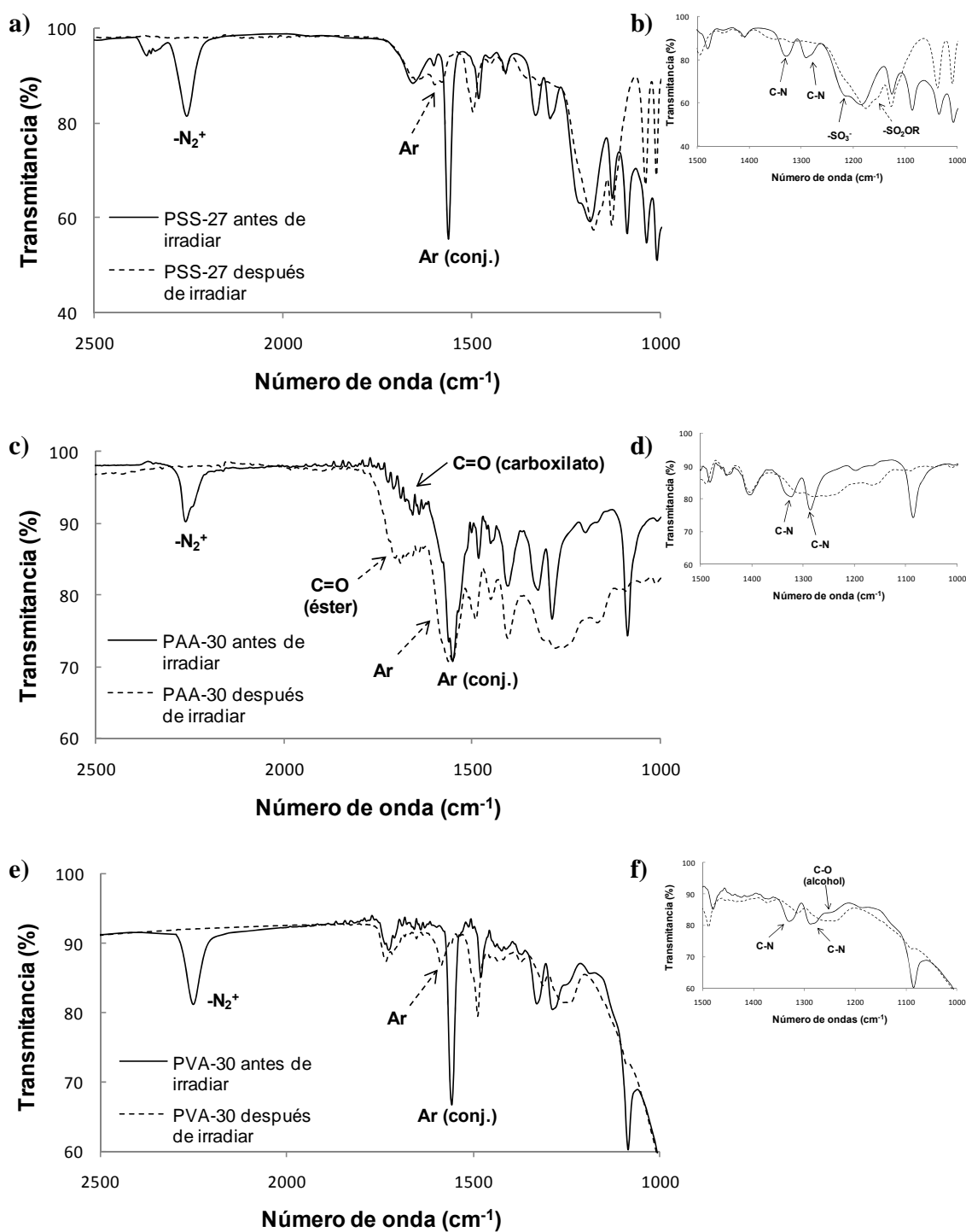


Fig. 10. Espectros IR de películas fotoreticulables de PSS-27 (a, b), PAA-30 (c, d) y PVA-30 (e, f) sobres sustratos de fluorita antes (línea continua) y después (línea discontinua) de irradiar con luz UV. Los espectros b, d y f son ampliaciones de los espectros a, c y e respectivamente.

3.2.5. ESTRUCTURACIÓN CON LUZ

El cambio de solubilidad asociado a la fotorreticulación se puede utilizar para crear estructuras de relieve mediante fotolitografía. Esta técnica se ha aplicado a películas obtenidas de las formulaciones fotorreticulables utilizando una máscara consistente en una estructura periódica de líneas transparentes y opacas de igual anchura (ver parte experimental). Tras este proceso de irradiación se pueden eliminar selectivamente las zonas que no han sido irradiadas quedando en el sustrato una estructura polimérica con los mismos motivos geométricos que la región transparente de la máscara fotolitográfica. De esta forma podemos generar por ejemplo líneas de diferentes periodos. En la figura 11 pueden verse imágenes de topografía, obtenidas con un microscopio confocal, de las estructuras generadas mediante fotolitografía en películas fotorreticulables de diferentes polímeros (PSS en la figura 11.a y PVA en la figura 11.b). En estas imágenes puede verse que el material de las zonas no expuestas es eliminado totalmente mediante el proceso de lavado con NaOH 0.06 M, mientras que las zonas expuestas permanecen (con una disminución del espesor del 10-15 % según medidas de perfilometría). Se puede ver también la rugosidad de las superficies, especialmente en PSS-27 (figura 11.a), que se corresponde con la morfología inicial de las películas (figura 7) y que se relaciona con la cristalinidad de las mismas.

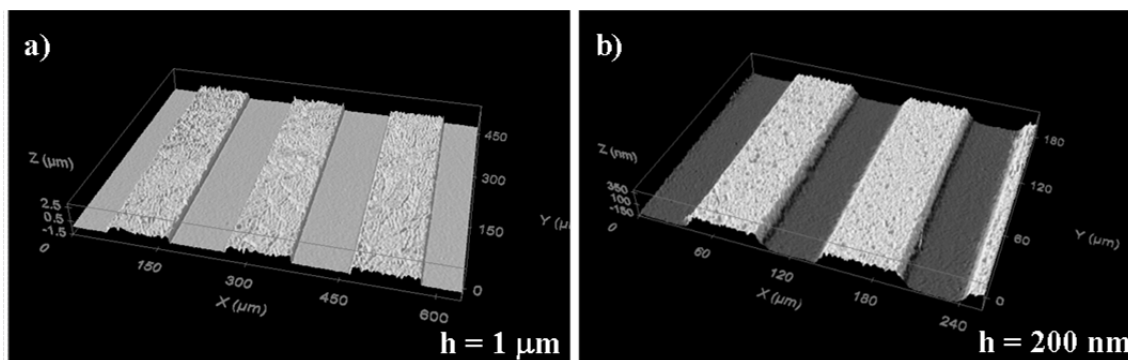


Fig. 11. Imágenes de topografía obtenidas con un microscopio confocal en las que se puede observar la topografía de estructuras de relieve obtenidas mediante fotolitografía en películas fotorreticulables de PSS-27 (a) y PVA-30 (b). La altura aproximada h de las estructuras está indicada en la esquina inferior derecha.

En el caso del poliacrilato de sodio se llevaron a cabo estudios de estructuración con luz a partir de películas preparadas con polímeros de distinto peso molecular (2000 y 225000). Para el polímero con peso molecular de 225000 (previamente estudiado en los estudios espectroscópicos), se obtuvieron patrones de relieve análogos a los de PSS-27 y PVA-30 representados en la figura 11. Estos estudios se llevaron a cabo también con un poliacrilato de sodio de peso molecular 2000, significativamente menor que en el caso anterior. En este caso la película reticula, pero durante el proceso de lavado se soltó del sustrato de vidrio sobre el que había sido preparada. Este hecho se atribuye a que si bien la reticulación efectiva del polímero evita su disolución sin embargo no es lo suficientemente alta para evitar el hinchamiento del polímero y su separación del sustrato.

3.3. RESUMEN

Se ha sintetizado un nuevo reticulante trifuncional basado en sales de diazonio de bajo peso molecular. La viabilidad de este compuesto como agente reticulante para polímeros que contengan grupos nucleófilos se ha estudiado con tres polímeros modelo. Uno de estos polímeros, el PVA, contiene grupos hidroxilo que es un grupo nucleófilo no iónico. Los otros dos polímeros (PSS y PAA) contienen grupos aniónicos como los grupos sulfonato y los grupos carboxilato, con los que el reticulante establece interacciones iónicas para dar lugar a complejos polielectrolíticos.

Los estudios de fotorreticulación se han llevado a cabo sobre películas fotorreticulables que contienen un porcentaje en peso de reticulante alrededor del 30% en peso. Estas películas han demostrado ser estables a temperatura ambiente y en ausencia de luz, lo que permite un manejo y almacenamiento apropiado de las películas. Los estudios de UV-Vis e IR demuestran la descomposición fotoinducida de los grupos diazonio y la reacción del reticulante con los grupos nucleófilos de los polímeros.

Se han aplicado además técnicas de estructuración con luz como la fotolitografía para la obtención de estructuras de relieve poliméricas a partir de las películas fotorreticulables. Los estudios realizados demuestran la efectividad del compuesto trifuncional de sales de diazonio como agente reticulante para polímeros con grupos nucleófilos. La presencia de estos grupos en polímeros naturales y la posibilidad de incorporarlos en polímeros sintéticos abre nuevas oportunidades para la preparación de biomateriales.

3.4. EXPERIMENTAL

3.4.1. MATERIALES

Como polímero modelo para la reacción con grupos sulfonato se ha utilizado poliestirensulfonato de sodio (PSS) de peso molecular alrededor de 70000 (Sigma-Aldrich). Como modelo para los grupos carboxilato se ha utilizado la sal de sodio de un poli(ácido acrílico) (PAA) de peso molecular 225000. Este polímero fue suministrado por Polyscience Europe GmbH en una disolución acuosa con un 20% en peso de polímero. La sal de sodio del poli(ácido acrílico) con peso molecular 2000 fue suministrada por Sigma-Aldrich. Como polímero modelo para los grupos hidroxilo se ha utilizado polialcohol vinílico (PVA) con masa molecular de 65000 y que fue suministrado por Sigma-Aldrich. Todos los polímeros se utilizaron sin purificación previa.

La sal triple de diazonio utilizada se preparó a partir del precursor N,N,N-tris(4-aminofenil)amina que fue suministrado por ORGANICA GmbH.

3.4.2. PREPARACIÓN DEL RETICULANTE

La preparación el reticulante trifuncional se llevó a cabo por diazotización de la N,N,N-tris(4-aminofenil)amina con NaNO_2 en medio ácido. Para llevar a cabo esta reacción se pesaron 100 mg de N,N,N-tris(4-aminofenil)amina (0.34 mmol) en un matraz de 5 mL y se disolvió en una mezcla de HCl 37% en peso (0.16 mL, 1.96 mmol HCl) y agua (0.50 mL) desionizada en un sistema de purificación Millipore Milli-Q (resistividad del agua: 18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$). La mezcla se enfrió en baño de hielo bajo agitación. Se disolvieron 85 mg (1.24 mmol) de NaNO_2 disueltos en 0.60 mL de agua

Milli-Q. Esta disolución de NaNO_2 se añadió a la mezcla de reacción gota a gota y lentamente y se dejó agitando durante 30 min a 0°C en oscuridad. La disolución de la sal de diazonio triple se utilizó sin purificación adicional para los experimentos de fotorreticulación de los polímeros.

Para la caracterización química del reticulante, la sal de diazonio triple se precipitó como un complejo con ZnCl_2 . Para ello se añadieron gota a gota 70.5 mg (0.52 mmol) de ZnCl_2 , disueltos en 0.50 mL de agua Milli-Q, a la disolución de la sal de diazonio trifuncional. La adición de ZnCl_2 llevó a la precipitación de un sólido marrón. Tras decantar la fase líquida el sólido se lavó con EtOH y se secó a vacío a temperatura ambiente y en oscuridad durante 2 días.

$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, D_2O , δ): 8.60 (d, $J = 9.3$ Hz, 6H), 7.78 (d, $J = 9.3$ Hz, 6H). IR (ATR, cm^{-1}): 2252 ($\text{N}\equiv\text{N}$), 1556 ($\text{ArC}=\text{C}$), 1328 (C-N), 1288 (C-N). Abs UV-Vis en H_2O (λ_{max} , nm): 428.

3.4.3. PREPARACIÓN DE FORMULACIONES Y ESTUDIOS DE PRECIPITACIÓN

Los estudios de precipitación de los complejos polielectrolíticos (PEC) entre el PSS y la sal de diazonio trifuncional se llevaron a cabo utilizando una disolución acuosa 0.12 M de los grupos diazonio y una disolución acuosa 0.15 M de PSS. A la disolución de los grupos diazonio, obtenida por dilución directa de la mezcla de reacción en agua Milli-Q, se le añadieron cantidades sucesivas de la disolución de PSS 0.15 M (también en agua Milli-Q) para que se formara el PEC. Para una relación $-\text{SO}_3^-/-\text{N}_2^+$ menor que 1 fue apareciendo paulatinamente un precipitado en el fondo del matraz que se redisolvió

a relaciones $-\text{SO}_3^-/\text{N}_2^+$ mayores que 1. Estos procesos de precipitación y redisolución fueron monitorizados por espectroscopia UV-Vis de la disolución resultante (líquido sobrenadante tras la precipitación del sólido) tras cada adición de PSS que fue medida en cubetas de cuarzo. A los valores de absorbancia de estas disoluciones se les aplicó una corrección de volumen tras cada adición para corregir el factor de dilución por las sucesivas adiciones (ecuación 2):

$$\text{Absorbancia corregida} = A \cdot \frac{V_t}{V_0} \text{ (ec. 2)}$$

Donde A es la absorbancia medida, V_t es el volumen total de la disolución tras cada adición sucesiva y V_0 es el volumen de la disolución de la sal de diazonio antes de comenzar las sucesivas adiciones de PSS.

3.4.4. PREPARACIÓN DE PELÍCULAS FOTORRETICULABLES

Para la preparación de películas fotorreticulables, una vez sintetizado el reticulante (apartado 3.4.2), se cogieron 0.125 mL del matraz de reacción (14.92 mg de la sal de diazonio triple, 0.036 mmol) y se añadieron directamente sobre una disolución del polímero correspondiente disuelto en la mínima cantidad de agua Milli-Q. Para el PSS se disolvieron 40 mg obteniéndose un porcentaje de reticulante del 27% (formulación codificada como PSS-27). Para el PAA y el PVA se utilizaron 34.83 mg de polímero para ajustar el porcentaje en peso del reticulante al 30% y obtener las formulaciones codificadas como PAA-30 y PVA-30 respectivamente.

Estas disoluciones se utilizaron para preparar películas por *spin coating* (un ciclo de 1000 rpm durante 5 s y otro ciclo de 3000 rpm durante 100 s) de estas disoluciones en sustratos limpios. Para la caracterización espectroscópica por absorbancia UV-Vis se

utilizaron sustratos de vidrio previamente tratados con ozono durante 5 min. Para la caracterización por IR se utilizaron sustratos de fluorita (CaF_2).

Las películas obtenidas tenían espesores de 1-2 μm para PSS-27 y PAA-30, mientras que en el caso del PVA-30 el grosor es de unos 200 nm aproximadamente debido al uso de disoluciones más diluidas de polímero (por su menor solubilidad en agua).

3.4.5. PROCESO DE FOTORRETICULACIÓN

Para la caracterización espectroscópica del proceso de reticulación se llevó a cabo una exposición total de la muestra a la iluminación con una lámpara de mercurio de 300 W (Oriel, modelo #6286; caja de la lámpara también de Oriel, modelo #66902) trabajando con un filtro de reflexión UV (Oriel, modelo #66218). Estas muestras fueron irradiadas durante 2 min con una intensidad de luz de 160 mW/cm^2 en el rango de 350-450 nm.

Para los experimentos de estructuración con luz mediante fotolitografía se irradió con la misma fuente de luz a través de una máscara fotolitográfica de líneas con diferentes períodos de red. Esta máscara se situó en contacto con la película fotorreticulable y el ensamblado muestra-máscara se irradió con la misma intensidad que las muestras anteriores durante 30 s. A continuación se eliminaron las zonas no expuestas mediante un lavado con una disolución acuosa de NaOH 0.06 M durante 10 s. Finalmente se lavó la muestra con un flujo de agua destilada y se secaron con un flujo de aire.

3.4.6. TÉCNICAS

Los espectros de ^1H -RMN fueron medidos en un espectrómetro Bruker AV-400 operando a 400 MHz usando agua deuterada (D_2O) y acetona deuterada como disolventes para el reticulante y el precursor respectivamente.

Los espectros de absorción UV-Vis fueron medidos usando un espectrofotómetro UV-Vis-IR Varian Cary 500. Los espectros de IR fueron medidos en un espectrofotómetro IR Bruker Vertex 70. Estos instrumentos se utilizaron tanto para la caracterización química del reticulante en disolución como para el seguimiento de la reacción de fotorreticulación en película.

Las películas se prepararon utilizando un *spin coater* Karl-Suss CT60. El grosor de las películas se midió utilizando un perfilómetro DEKTAK. La observación de la morfología de las películas se llevó a cabo en un microscopio de polarización OLYMPUS BH-2 equipado con una cámara digital Olympus. Las imágenes topográficas de las estructuras fueron adquiridas en un microscopio confocal Dual Sensofar PL μ 2300 trabajando en modo confocal.

***4. FOTORRETICULACIÓN DE
HIALURONATO DE SODIO
CON UNA SAL DE DIAZONIO
TRIFUNCIONAL***

*(parte de los resultados de este capítulo han sido publicados en la revista
Carbohydrate Polymers, 2012, Vol. 90, p. 419-430)*

4.1. INTRODUCCIÓN

Tal y como se ha comentado en el capítulo de introducción, los polímeros naturales poseen unas propiedades que los hacen muy atractivos para aplicaciones biomédicas. Además de ser generalmente biodegradables, lo cual supone una ventaja en este tipo de aplicaciones,^{1, 2} los polímeros naturales muestran actividad biológica ya que pueden estimular diversos procesos celulares como la diferenciación, la adhesión, la proliferación o la migración.^{3, 4} Un ejemplo de este tipo de polímeros es el ácido hialurónico (HA) y sus sales derivadas. Este es un glicosaminoglicano de alto peso molecular (~1000000 Da) que se encuentra principalmente en los tejidos conectivos de los mamíferos como por ejemplo el humor vítreo del ojo, el líquido sinovial de las articulaciones o el cordón umbilical. El HA está involucrado en procesos biológicos muy diversos como la angiogénesis,^{5, 6} la formación de órganos⁷ o la curación de heridas.⁸

Debido a estas características, el HA es un precursor interesante para la preparación de biomateriales y se ha estudiado ampliamente la modificación de su estructura química para tratar de modular sus propiedades.^{9, 10, 11} En particular, se ha investigado la posibilidad de reticular el polímero para obtener biomateriales con

¹ Gomes, M.E., Reis, R.L. *Int. Mater. Rev.*, **2004**, 49, 261-273.

² Nair, L.S., Laurencin, C.T. *Prog. Polym. Sci.*, **2007**, 32, 762-798.

³ Dutta, R.C., Dutta, A.K. *Biotechnol. Adv.*, **2010**, 28, 764-769.

⁴ Friedl, P., Zänker, K.S., Bröcker, E.B. *Microsc. Res. Tech.*, **1998**, 43, 369-378.

⁵ Raines, A.L., Sunwoo, M.H., Gertzman, A.A., Thacker, K., Guldborg, R.E., Schwartz, Z., Boyan, B.D. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2011**, 96, 575-583.

⁶ Perng, C.K., Wang, Y.J., Tsi, C.H., Ma, H. *J. Surg. Res.*, **2011**, 168, 9-15.

⁷ Masters, K.S., Shah, D.N., Leinwand, L.A., Anseth, K.S. *Biomaterials*, **2005**, 26, 2517-2525.

⁸ Chen, W.Y.J., Abatangelo, G. *Wound Rep. Reg.*, **1999**, 7, 79-89.

⁹ Rinaudo, M. *Polym. Int.*, **2008**, 57, 397-430.

¹⁰ Malafaya, P.B., Silva, G.A., Reis, R.L. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2007**, 59, 207-233.

¹¹ Burdick, J.A., Prestwich, G.D. *Adv. Mater.*, **2011**, 23, H41-H56.

posible aplicación como andamiajes para Ingeniería de Tejidos^{7, 12, 13, 14} o como transportador para liberación controlada de fármacos.^{15, 16}

Los grupos funcionales que se encuentran en el HA han permitido el desarrollo de diversas estrategias de reticulación (figura 1). Por ejemplo, el HA se ha entrecruzado químicamente usando carbodiimidas¹⁷ o dihidrazidas¹⁸ como agente reticulante. También se ha estudiado la funcionalización con grupos acrilato o metacrilato para su posterior entrecruzamiento mediante polimerización radicalaria^{7, 19} o por reacción de adición de Michael con tioles multifuncionales.^{14, 20, 21, 22, 23} Estos estudios han demostrado que se pueden modificar las propiedades del material controlando los parámetros del proceso de reticulación. Por ejemplo, un cambio en el grado de metacrilación, y por lo tanto en el grado de reticulación de la red resultante, lleva a la obtención de biomateriales con distintas propiedades mecánicas.²⁴ Entre las distintas estrategias utilizadas para llevar a cabo la reticulación del HA, aquellas inducidas por luz han demostrado ser de gran interés en la generación de biomateriales,^{25, 26} ya que permiten aplicar técnicas de estructuración con luz para generar estructuras de

¹² Nuernberger, S., Cyran, N., Albrecht, C., Redl, H., Vécsei, V., Marlovits, S. *Biomaterials*, **2011**, *32*, 1032-1040.

¹³ Camci-Unal, G., Aubin, H., Ahari, A.F., Bae, H., Nichol, J.W., Khademhosseini, A. *Soft Matter*, **2010**, *6*, 5120-5126.

¹⁴ Lei, Y., Gojgini, S., Lam, J., Segura, T. *Biomaterials*, **2010**, *32*, 39-47.

¹⁵ Inukai, M., Jin, Y., Yomota, C., Yonese, M. *Chem. Pharm. Bull.*, **2000**, *48*, 850-854.

¹⁶ Patterson, J., Siew, R., Herring, S.W., Lin, A.S.P., Guldborg, R., Stayton, P.S. *Biomaterials*, **2010**, *31*, 6772-6781.

¹⁷ Tomihata, K., Ikada, Y. *J. Biomed. Mater. Res.*, **1997**, *37*, 243-251.

¹⁸ Vercruyse, K.P., Marecak, D.M., Marecek, J.F., Prestwich, G.D. *Bioconjugate Chem.*, **1997**, *8*, 686-694.

¹⁹ Kutty, J.K., Cho, E., Lee, J.S., Vyavahare, N.R., Webb, K. *Biomaterials*, **2007**, *28*, 4928-4938.

²⁰ Kim, J., Park, Y., Tae, G., Lee, K.B., Hwang, C.M., Hwang, S.J., Kim, I.S., Noh, I., Sun, K. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2009**, *88*, 967-975.

²¹ Ji, Y., Ghosh, K., Shu, X.Z., Li, B., Sokolov, J.C., Prestwich, G.D., Clark, R.A.F., Rafailovich, M.H. *Biomaterials*, **2006**, *27*, 3782-3792.

²² Shu, X.Z., Liu, Y., Palumbo, F.S., Luo, Y., Prestwich, G.D. *Biomaterials*, **2004**, *25*, 1339-1348.

²³ Shu, X.Z., Ahmad, S., Liu, Y., Prestwich, G.D. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2006**, *79*, 902-912.

²⁴ Bencherif, S.A., Srinivasan, A., Horkay, F., Hollinger, J.O., Matyjaszewski, K., Washburn, N.R. *Biomaterials*, **2008**, *29*, 1739-1749.

²⁵ Van Tomme, S.R., Storm, G., Hennink, W.E. *Int. J. Pharm.*, **2008**, *355*, 1-18.

²⁶ Oh, J.K., Drumright, R., Siegwart, D.J., Matyjaszewski, K. *Prog. Polym. Sci.*, **2008**, *33*, 448-477.

geometría controlada.^{27, 28} Estas estructuras pueden servir para controlar y dirigir la adhesión y proliferación celular.^{12, 29, 30}

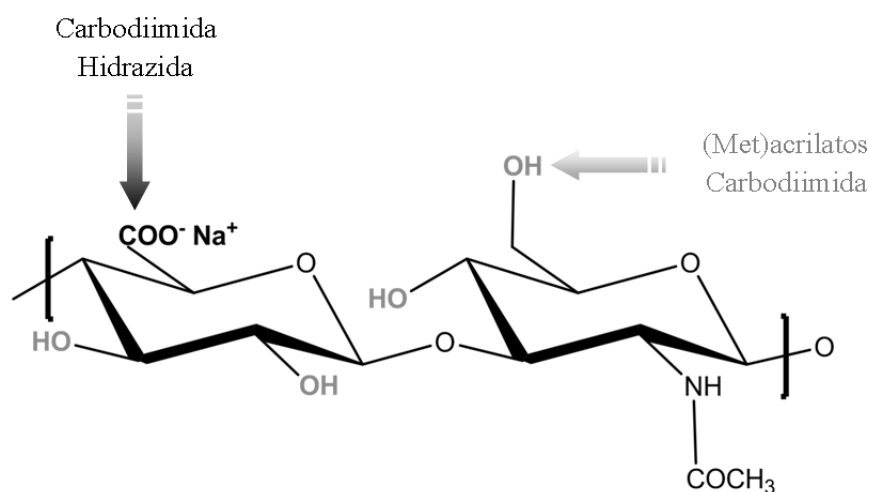


Fig. 1. Estructura química del HA (sal sódica) y posible modificación química de sus grupos funcionales.

Hasta la fecha, la fotorreticulación del HA se ha llevado a cabo principalmente por fotopolimerización radicalaria de grupos acrilato introducidos en la cadena del HA.^{7, 19} Como se ha comentado en capítulos anteriores, este proceso de polimerización da lugar a la formación de cadenas acrílicas no biodegradables de alto peso molecular que pueden resultar difíciles de eliminar por el organismo. Una alternativa a esta fotoquímica basada en grupos acrilatos son las reacciones fotoinducidas que implican dos grupos funcionales diferentes (A y B) como es el caso de la fotoquímica de tioleños.³¹ Sin embargo, la aplicación de la química de tioleños a la fotorreticulación de HA requiere de una modificación química previa de las cadenas poliméricas del HA para introducir los grupos reactivos (ya sean tioles o dobles enlaces). La

²⁷ Bratton, D., Yang, D., Dai, J., Ober, C.K. *Polym. Adv. Technol.*, **2006**, *17*, 94-103.

²⁸ Melchels, F.P.W., Feijen, J., Grijpma, D.W. *Biomaterials*, **2010**, *31*, 6121-6130.

²⁹ Khetan, S., Burdick, J.A. *Soft Matter*, **2011**, *7*, 830-838.

³⁰ Seidlits, S.K., Schmidt, C.E., Shear, J.B. *Adv. Funct. Mater.*, **2009**, *19*, 3543-3551.

³¹ Hoyle, C.E., Bowman, C.N. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 1540-1573.

fotorreticulación del HA, así como de polímeros naturales en general, mediante una reacción que no requiera una modificación previa del mismo es una aproximación interesante para su aplicación en la preparación de biomateriales. En este sentido, en el capítulo 3 se ha descrito que la fotodescomposición de sales de diazonio permite la fotorreticulación de polímeros con grupos nucleófilos tales como los grupos carboxilato e hidroxilo. La presencia de estos grupos nucleófilos en el HA constituye una oportunidad para la fotorreticulación de este polímero natural sin modificación alguna con compuestos multifuncionales de sales de diazonio. Esta estrategia se podría extender además a otros polímeros naturales como la heparina o el sulfato de condroitina, por ejemplo, que contienen grupos sulfato capaces de reaccionar con las sales de diazonio.^{32, 33, 34} Este proceso permite además aplicar técnicas de estructuración con luz, tal y como se ha comprobado en el capítulo anterior, y no requiere de fotoiniciador, que podría resultar tóxico para las células.³⁵

En este capítulo se describe el uso de la sal de diazonio trifuncional de bajo peso molecular descrita en el capítulo 3 para la reticulación de hialuronato de sodio sin necesidad de modificarlo químicamente (esquema 1), y utilizando formulaciones fotorreticulables preparadas en disolución acuosa gracias a la naturaleza iónica de ambos componentes. Se prepararán formulaciones con distinto porcentaje de reticulante a partir de las cuales se procesarán películas fotorreticulables por *spin coating*. Estas películas serán utilizadas para estudiar el proceso de reticulación con luz mediante técnicas espectroscópicas. En los biomateriales preparados a partir de estos sistemas con distinto porcentaje de reticulante, se estudiará la biocompatibilidad para su aplicación como sustratos para el crecimiento celular con dos líneas celulares distintas: células

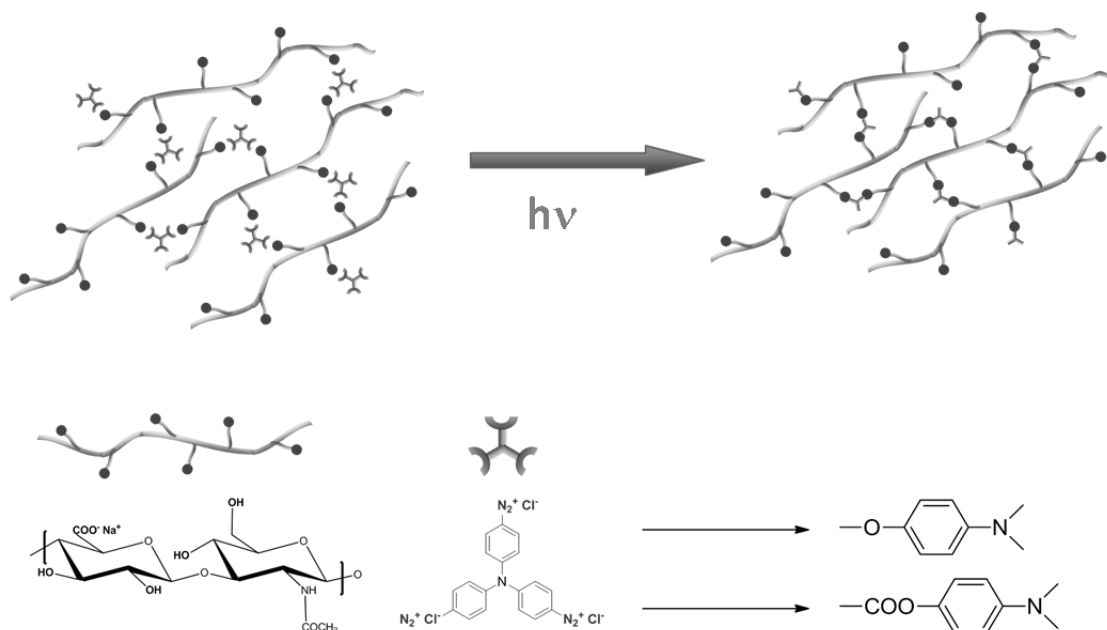
³² Cao, W., Ye, S., Cao, S., Zhao, C. *Macromol. Rapid Commun.*, **1997**, *18*, 983-989.

³³ Zhang, Y., Cao, W. *J. Polym. Sci. A*, **2000**, *38*, 2566-2571.

³⁴ Sun, J., Wu, T., Sun, Y., Wang, Z., Zhang, X., Shen, J., Cao, W. *Chem. Commun.*, **1998**, 1853-1854.

³⁵ Fridovich, I. *J. Exp. Biol.*, **1998**, *201*, 1203-1209.

tumorales HeLa y fibroblastos COS-7 como línea celular sana. Con ellos se prepararán estructuras bidimensionales de geometría controlada mediante escritura directa con láser (*Direct Laser Writing* - DLW) para estudiar la adhesión de las células sobre dichas estructuras.



Esquema 1. Esquema de la reticulación fotoinducida del hialuronato de sodio con un reticulante multifuncional basado en sales de diazonio.

4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2.1. FOTORRETICULACIÓN DEL HIALURONATO DE SODIO

El ácido hialurónico contiene grupos hidroxilo y carboxilato tal y como puede verse en su estructura química, presentado en la figura 1. En el capítulo 3 se ha descrito la reactividad de la sal de diazonio trifuncional derivada de la N,N,N-tris(4-aminofenil)amina con polímeros que contienen estos grupos funcionales utilizando poliacrilato de sodio y polivinil alcohol como polímeros modelo. Consecuentemente es

factible plantear la fotorreticulación del hialuronato de sodio utilizando el mismo reticulante. Para verificar la reacción se llevó a cabo la irradiación de películas fotorreticulables obtenidas a partir de formulaciones de ácido hialurónico con diferentes cantidades de reticulante y se caracterizó el proceso por espectroscopia UV-Vis e IR tal y como se hizo con los sistemas modelo. Las películas fotorreticulables se prepararon por *spin coating* a partir de formulaciones con un 5% y 20% en peso del reticulante (codificadas como H5 y H20 respectivamente). Con porcentajes superiores (30% en peso, como se había hecho con los compuestos modelo) se obtenían disoluciones no homogéneas. Debido a la viscosidad de las formulaciones fotorreticulables, el segundo ciclo del proceso de *spin coating* a 3000 rpm fue extendido hasta 180 s para favorecer una adecuada eliminación del disolvente en la preparación de la película.

Estas películas muestran una banda de absorción debida a la transición $\pi-\pi^*$ de los grupos diazonio que aparece en torno a 424 nm. El proceso de descomposición fotoinducida de los grupos diazonio, monitorizado por espectroscopia UV-Vis, muestra la completa desaparición de esta banda tras la irradiación con luz UV (figura 2), lo que confirma la descomposición fotoinducida de estos grupos diazonio.

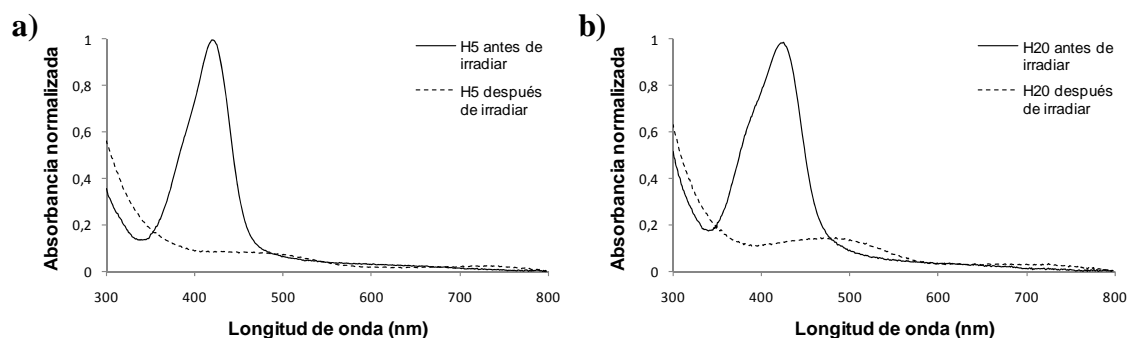


Fig. 2. Espectros de Abs UV-Vis de H5 (a) y H20 (b) antes y después de irradiar con luz UV.

También se caracterizó el proceso de reticulación por espectroscopia IR, para lo que se seleccionó la muestra de H20, que contiene mayor cantidad de reticulante y por lo tanto facilita la detección de cambios en las bandas de los grupos funcionales tras el proceso de irradiación. En la figura 3 puede verse la desaparición de la banda del grupo diazonio a 2266 cm^{-1} , a la par que se produce un desplazamiento de la banda $\text{ArC}=\text{C}$ (1562 cm^{-1} en el reticulante) lo que indica la descomposición fotoinducida del grupo diazonio. Junto a estas modificaciones, aparece una nueva señal a 1740 cm^{-1} que se atribuye a la vibración del enlace $\text{C}=\text{O}$ del grupo éster formado tras la irradiación. El proceso de irradiación también provoca una serie de cambios en la zona de $1200\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ donde inicialmente se pueden ver dos bandas a 1305 cm^{-1} y 1340 cm^{-1} que se atribuyen a los enlaces C-N de los grupos aromáticos del reticulante con la sal de diazonio y el N central. Tras la irradiación, estas dos señales desaparecen y aparecen una banda a 1323 cm^{-1} y otra banda ancha centrada en 1250 cm^{-1} . Estos cambios pueden atribuirse al proceso de descomposición fotoinducido del reticulante y a la consiguiente formación de enlaces éster y éter que dan lugar a bandas en esta zona por la vibración de los enlaces C-O . Además, tanto las películas de H5 como las de H20, se vuelven insolubles en disolución acuosa de NaOH tras la exposición con luz UV, lo que confirma el proceso de fotorreticulación efectivo del polímero. A diferencia de los procesos descritos hasta la fecha, esta fotorreticulación se ha llevado a cabo sin necesidad de modificar previamente el polímero y sin la adición de fotoiniciador.

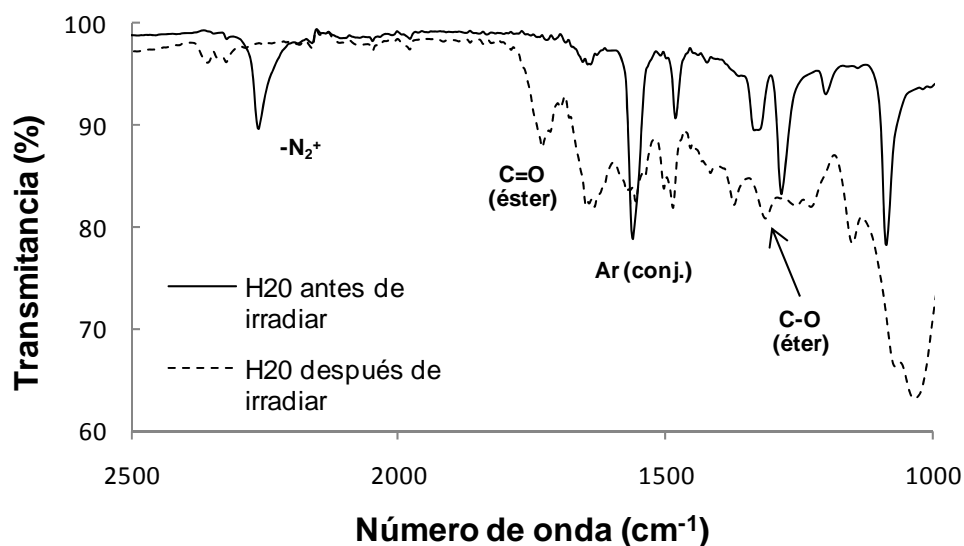


Fig. 3. Espectro IR de una película fotorreticulable de H2O antes y después de irradiar con luz UV.

La descomposición fotoinducida de las sales de diazonio puede ser extendida a la reticulación de otros polímeros naturales. Por ejemplo, la heparina contiene grupos sulfato, carboxilato e hidroxilo que pueden reaccionar con el reticulante trifuncional una vez producida la fotodescomposición, dando lugar a la reticulación del polímero. Para estudiar esta posibilidad se llevó a cabo la reticulación de heparina (figura 4) con un 30% en peso del reticulante (formulación codificada como Hep-30).

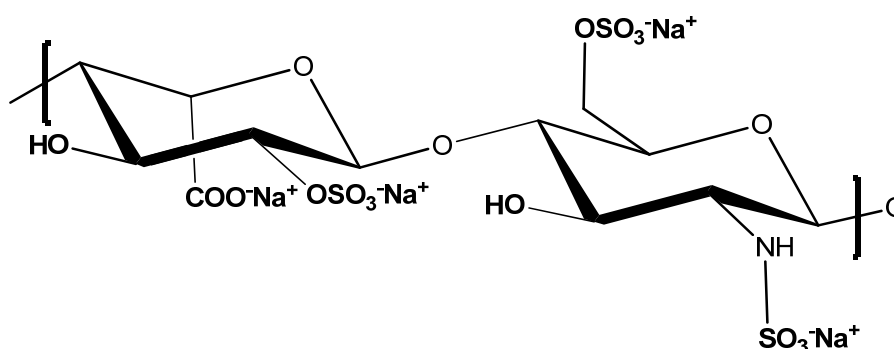


Fig. 4. Estructura química de la heparina.

Al igual que con el hialuronato de sodio, el proceso de fotorreticulación fue monitorizado por espectroscopias UV-Vis e IR (figura 5). De nuevo, en el espectro de UV-Vis puede verse la desaparición de la banda a 424 nm (figura 5.a), mientras que por espectroscopia IR (figura 5.b) desaparece la banda a 2160 cm^{-1} del grupo diazonio a la vez que la banda a 1560 cm^{-1} de los grupos aromáticos conjugados se desplaza. Estas películas de Hep-30 también se vuelven insolubles en disoluciones acuosas de NaOH una vez reticuladas, lo que indica que el proceso de reticulación ha sido efectivo. No obstante, la película se suelta del sustrato de vidrio, tras la inmersión en agua, como una lámina entera. Esto podría deberse a un hinchamiento de la película en disolución acuosa, lo que se atribuye a un bajo grado de entrecruzamiento de la red polimérica. Esto podría ser debido al bajo peso molecular de la heparina comercial ($P_m \approx 30000$) ya que se observó un comportamiento similar para la sal de sodio del ácido poliacrílico con menor peso molecular. No obstante, el hecho de que la película no se disuelva es una prueba macroscópica de que el proceso de reticulación ha sido efectivo, lo que concuerda con las conclusiones derivadas de los estudios espectroscópicos del proceso de irradiación.

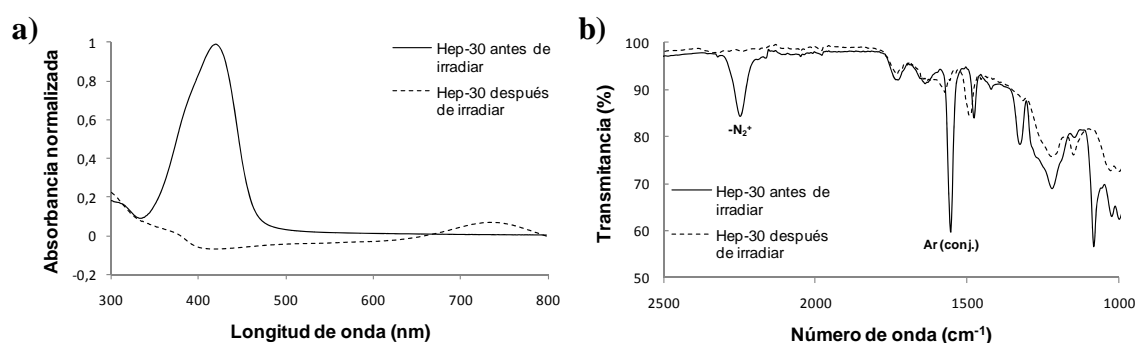
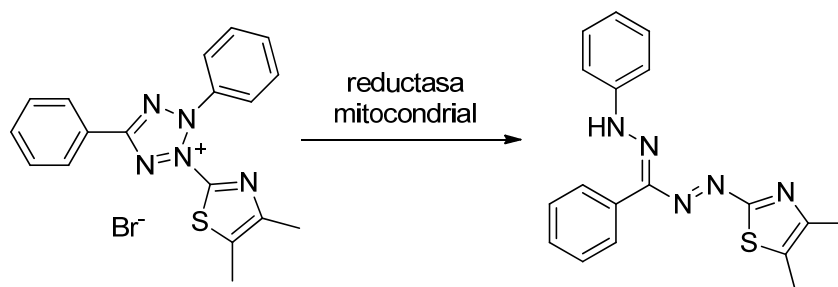


Fig. 5. Espectros de Abs UV-Vis (a) e IR (b) de películas fotorreticulables de Hep-30 antes y después de irradiar con luz UV.

4.2.2. ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD

Para estudiar la biocompatibilidad de los materiales obtenidos a partir del hialuronato de sodio y el reticulante (H5 y H20) como sustratos para el cultivo celular, se realizaron ensayos de MTT.³⁶ Estos ensayos consisten en cultivar un determinado número de células sobre una superficie y, tras el tiempo de cultivo deseado, adicionar bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) para que las células lo metabolicen a formazán (esquema 2). Este ensayo es uno de los más típicos para estudiar la viabilidad celular y se basa en la actividad mitocondrial de las células vivas que realizan dicha transformación de MTT en formazán. Este compuesto presenta una banda de absorción en disolución de DMSO a 570 nm cuya intensidad es proporcional a la cantidad de MTT metabolizado por las células y por lo tanto permite cuantificar, de forma indirecta, el número de células vivas adheridas sobre el sustrato.



Esquema 2. Transformación del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en formazán por acción de enzimas reductasas mitocondriales.

Estos ensayos se realizaron cultivando las células sobre los materiales basados en hialuronato de sodio con distinta cantidad de reticulante (H5 y H20). Estos estudios se realizaron también sobre sustratos de vidrio sin material polimérico que fueron utilizados como referencia. Al valor obtenido de estos estudios sobre vidrio se le

³⁶ Mosmann, T. J. *Immunol. Methods*, **1983**, 65, 55-63.

atribuyó un porcentaje de viabilidad celular del 100% (valor de referencia) ya que el vidrio es un sustrato biocompatible sobre el que las células pueden adherirse y proliferar. Los valores de viabilidad celular obtenidos para las células cultivadas sobre las películas poliméricas se calcularon en relación al valor obtenido en los sustratos de vidrio.

Los estudios de biocompatibilidad, al igual que el resto de ensayos celulares de esta memoria, se llevaron a cabo con dos líneas celulares distintas ya que la respuesta puede ser diferente según el tipo de célula. Como modelo se utilizaron células tumorales HeLa, que son un tipo de células duraderas y con alta velocidad de proliferación, y fibroblastos COS-7 que es una línea celular sana que sirve como modelo de las células humanas.

Las células se cultivaron sobre los distintos sustratos H5, H20 (ambos depositados sobre vidrio) y vidrio de referencia durante 24, 48 y 72 h, periodo tras el cual, con la densidad de células utilizadas en el cultivo, el sustrato está prácticamente cubierto de células. Para realizar los ensayos, tras el cultivo durante el tiempo correspondiente se adicionó la disolución de MTT en disolución tampón fosfato (PBS), que mimetiza el pH y la concentración salina de los organismos vivos. Tras la incubación durante 4 h con este compuesto se retira el medio de cultivo y el PBS de la disolución de MTT, y los cristales de formazán metabolizados por las células se disolvieron con DMSO. La absorción a 570 nm de las disoluciones moradas obtenidas se midió en un espectrómetro para placas de cultivo celular.

En la figura 6 puede verse que ambos materiales, obtenidos por reticulación del hialuronato de sodio con diferente cantidad de reticulante, muestran porcentajes de viabilidad celular muy próximos al 100% (que representa la proliferación celular sobre

los sustratos de vidrio control), por lo que se puede concluir que no resultan tóxicos para ninguna de las dos líneas celulares estudiadas.

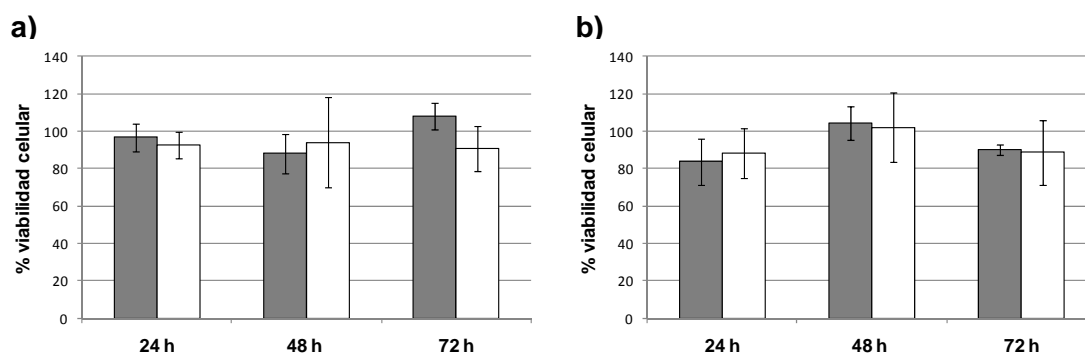


Fig. 6. Porcentaje de viabilidad celular de células tumorales HeLa (a) y fibroblastos COS-7 (b) cultivadas sobre películas poliméricas de H5 (barra gris) y H20 (barra blanca).

4.2.3. ESTRUCTURACIÓN CON LUZ

Una vez comprobada la biocompatibilidad del material reticulado se procedió a su estructuración. Tal y como se ha comentado en el capítulo de la Antecedentes, las interacciones que establece una célula con el sustrato al que está adherida dependen de diversos factores físico-químicos,^{37, 38} biológicos^{39, 40} y topográficos^{37, 41, 42, 43} que pueden, por lo tanto, influir en los procesos de adhesión y proliferación celular. El uso de técnicas de estructuración con luz permite generar microestructuras de geometría controlada que pueden influir en estos procesos biológicos. Con este propósito, se generaron patrones bidimensionales de los materiales poliméricos en los que estudiar los procesos de adhesión celular.

³⁷ Scharnagl, J., Lee, S., Hiebl, B., Sisson, A., Lendlein, A. *J. Mater. Chem.*, **2010**, *20*, 8789-8802.

³⁸ Hervy, M. *J. Adhes. Sci. Technol.*, **2010**, *24*, 963-973.

³⁹ Hersel, U., Dahmen, C., Kessler, H. *Biomaterials*, **2003**, *24*, 4385-4415.

⁴⁰ Re'em, T., Tsur-Gang, O., Cohen, S. *Biomaterials*, **2010**, *31*, 6746-6755.

⁴¹ Schulte, V.A., Diez, M., Möller, M., Lensen, M.C. *Biomacromolecules*, **2009**, *10*, 2795-2801.

⁴² Zorlutuna, P., Elsheikh, A., Hasirci, V. *Biomacromolecules*, **2009**, *10*, 814-821.

⁴³ Dalby, M.J., Gadegaard, N., Tare, R., Andar, A., Riehle, M.O., Herzyk, P., Wilkinson, C.D.W., Oreffo, R.O.C. *Nat. Mater.*, **2007**, *6*, 997-1003.

La estructuración del material se llevó a cabo por escritura directa con láser (*Direct Laser Writing - DLW*) en películas fotorreticulables de H5 y H20. Para ello se utilizó un montaje experimental (figura 7) consistente en un láser de diodo de 405 nm que genera un haz colimado que es focalizado sobre la muestra utilizando para ello un objetivo de microscopio. La muestra se coloca sobre una plataforma XY controlada por ordenador. La posición en Z del objetivo se regula mediante un tornillo micrométrico de manera que se hace coincidir el plano focal con la película fotorreticulable. Con el movimiento de la muestra en las direcciones X e Y del plano, el proceso de fotorreticulación tiene lugar selectivamente en las líneas que han sido irradiadas por el láser, generándose así líneas de material fotorreticulado con una geometría controlada.

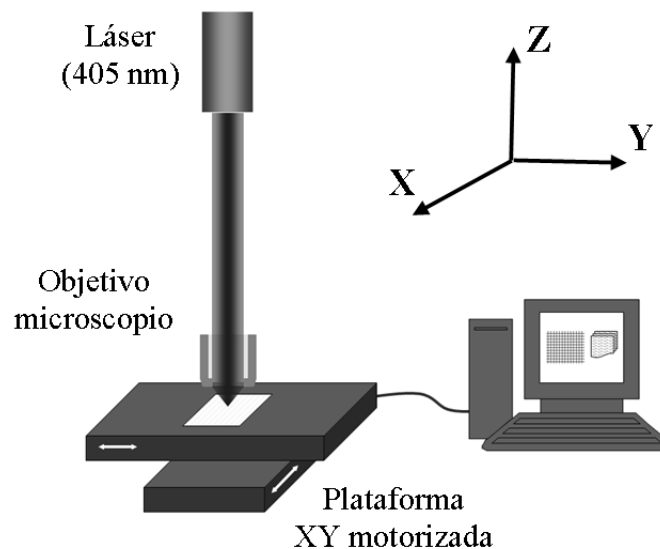


Fig. 7. Esquema del montaje para llevar a cabo la estructuración de películas fotorreticulables por DLW.

La anchura de estas líneas puede controlarse variando ligeramente la posición del plano focal respecto al plano de la película (figura 8), mientras que la altura puede modificarse controlando el espesor de la película fotorreticulable, en este caso modificando el tiempo o la velocidad de giro en el proceso de preparación de la misma

por *spin coating*. La velocidad en el movimiento de la muestra durante el proceso de irradiación permite a su vez controlar el tiempo de exposición, lo que puede influir en el grado de entrecruzamiento. Tras la irradiación, el material no reaccionado se elimina utilizando un disolvente adecuado que elimine selectivamente las zonas no expuestas a la luz UV, dejando las expuestas adheridas al sustrato.

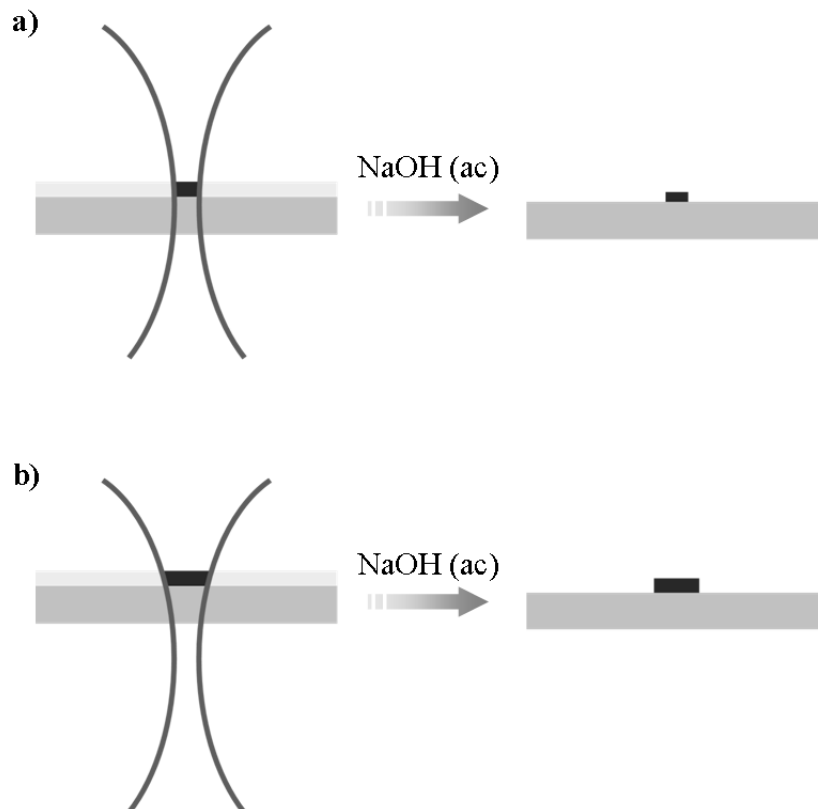


Fig. 8. Obtención de estructuras con distinta anchura mediante irradiación con un haz de luz láser focalizado sobre la muestra (a) o ligeramente desplazada del plano focal (b).

Para los estudios de adhesión celular se generaron estructuras compuestas por conjuntos de líneas paralelas con una anchura típica de 30 - 50 μm , que está en el orden de las dimensiones celulares. Esto se consiguió situando la muestra fuera del plano focal del haz de luz láser. Tras la irradiación con el montaje de la figura 7, se llevó a cabo un proceso de lavado con NaOH 0.06 M para eliminar las zonas no expuestas de la

película. La altura de las estructuras resultantes (figura 9) es del orden de 150 nm para H5 y 400 nm para H20, menor que el grosor inicial de la película (500 nm para H5 y 1000 nm para H20). Esta disminución se atribuye a una eliminación parcial del material reticulado durante el proceso de lavado con NaOH.

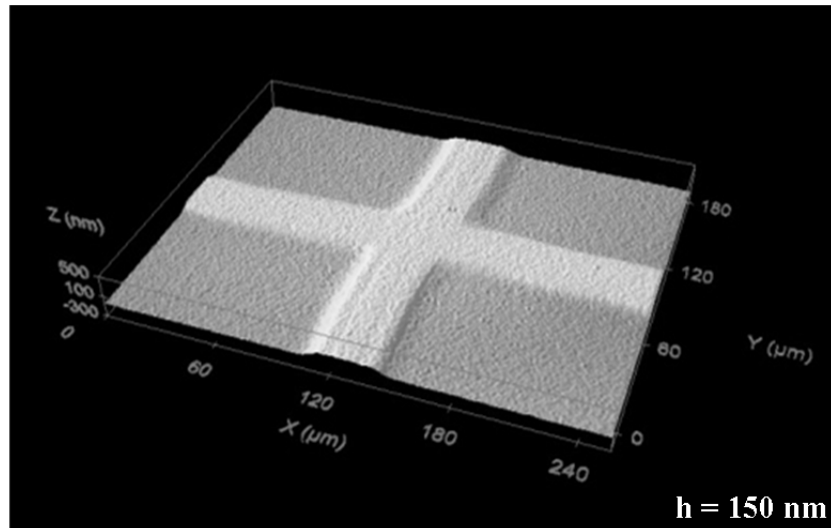


Fig. 9. Imagen de topografía obtenida con un microscopio confocal en las que se puede observar la topografía de una estructura de relieve obtenida mediante fotolitografía en películas fotorreticulables de H5. La altura aproximada (h) de las estructuras está indicada en la esquina inferior derecha.

4.2.4. ESTUDIOS DE ADHESIÓN CELULAR

Con el fin de estudiar la adhesión celular sobre los diferentes materiales poliméricos, se llevó a cabo el cultivo de las células tumorales HeLa y los fibroblastos COS-7 sobre películas estructuradas de H5 y H20 soportados en vidrio que fueron fotorreticuladas selectivamente por DLW. A continuación se llevó a cabo el **marcaje fluorescente de las fibras de actina** que es uno de los principales componentes estructurales del citoesqueleto celular y nos permite obtener información de cómo se

distribuye éste y si la célula muestra alguna orientación preferente.^{44, 45} Estos estudios se llevaron a cabo fijando la membrana celular mediante reticulación de las proteínas de la misma con formaldehído. A continuación se llevó a cabo el marcaje de la actina mediante anticuerpos marcados fluorescentemente (fluoróforo verde Alexa Fluor 488) que se unen específicamente a esta proteína. Los núcleos por su parte fueron marcados con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que se intercala entre el ADN de los mismos y da fluorescencia de color azul.

Estos estudios revelaron que tanto las células tumorales HeLa como los fibroblastos COS-7 tienden a adherirse selectivamente al vidrio cuando son cultivados sobre patrones del material H5 microestructurado. En la figura 10 puede verse que, tras 72 h de cultivo, las áreas de vidrio sin material están cubiertas de células casi en su totalidad, por lo que estas áreas se visualizan en color verde debido al marcaje fluorescente de las células. Sin embargo, en las líneas de material polimérico no se ha adherido ninguna célula por lo que no se detecta fluorescencia y son visualizadas en color negro.

⁴⁴ Reisler, E. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1993**, 5, 41-47.

⁴⁵ Furukawa, R., Fehheimer, M. *Int. Rev. Cytol.*, **1997**, 175, 29-90.

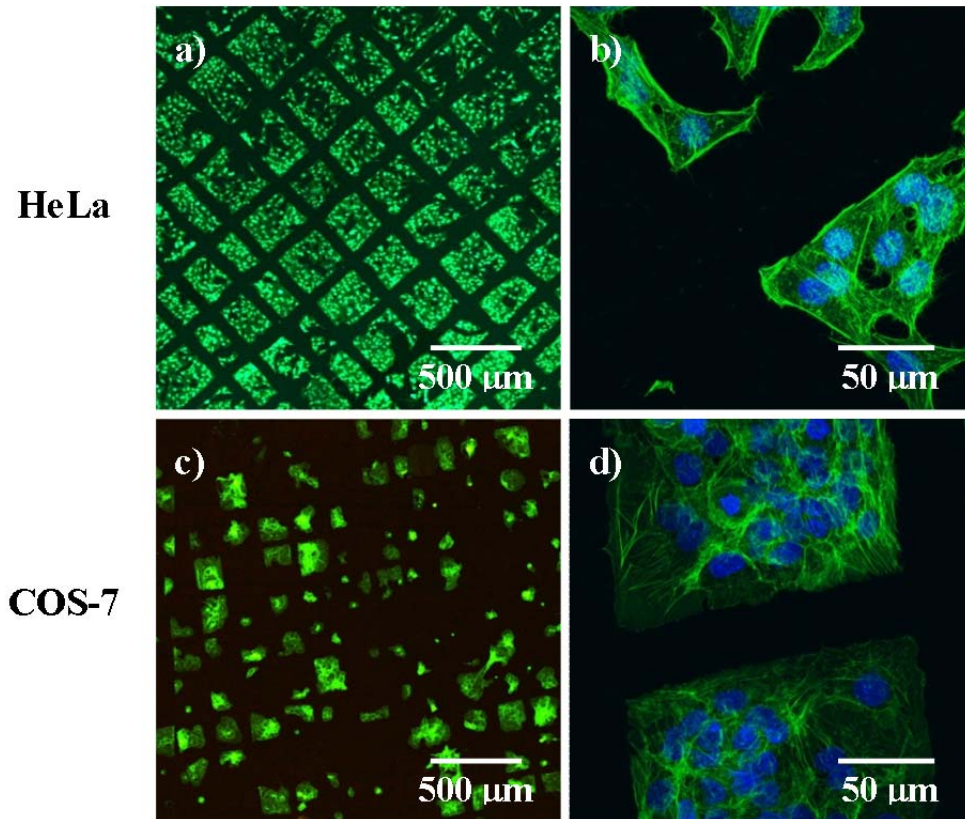


Fig. 10. Imágenes de microscopía confocal de un marcaje fluorescente de las fibras de actina con el fluoróforo verde Alexa Fluor 488 y de los núcleos con DAPI (ver parte experimental) en células tumorales HeLa (a, b) y fibroblastos COS-7 (c, d) tras 72 h de cultivo sobre patrones del material polimérico H5.

En los patrones de H20 no se observa esta adhesión selectiva de las células en el vidrio sino que ambas líneas celulares proliferan indistintamente sobre el material polimérico H20 y sobre las áreas de vidrio sin polímero H20 (figura 11). En estas películas, con mayor cantidad de reticulante, puede llegar a verse la línea de material en color rojo (figuras 11.a y 11.d) debido a la emisión del reticulante en esta región del visible. Las células, marcadas con el fluoróforo verde Alexa Fluor 488, se ven localizadas tanto en las líneas de material polimérico (en rojo), como en las zonas con vidrio (cuadrados en negro). Este hecho se aprecia en las imágenes de contraste de fase

obtenidas con el objetivo de 60 aumentos (figuras 11.c para células HeLa y 11.f para fibroblastos COS-7) en las que se ha observado en algunas células HeLa una cierta orientación a lo largo del material polimérico (sombreada en blanco para mayor claridad en las imágenes de contraste de fase) y una orientación de las fibras de actina en la misma dirección.

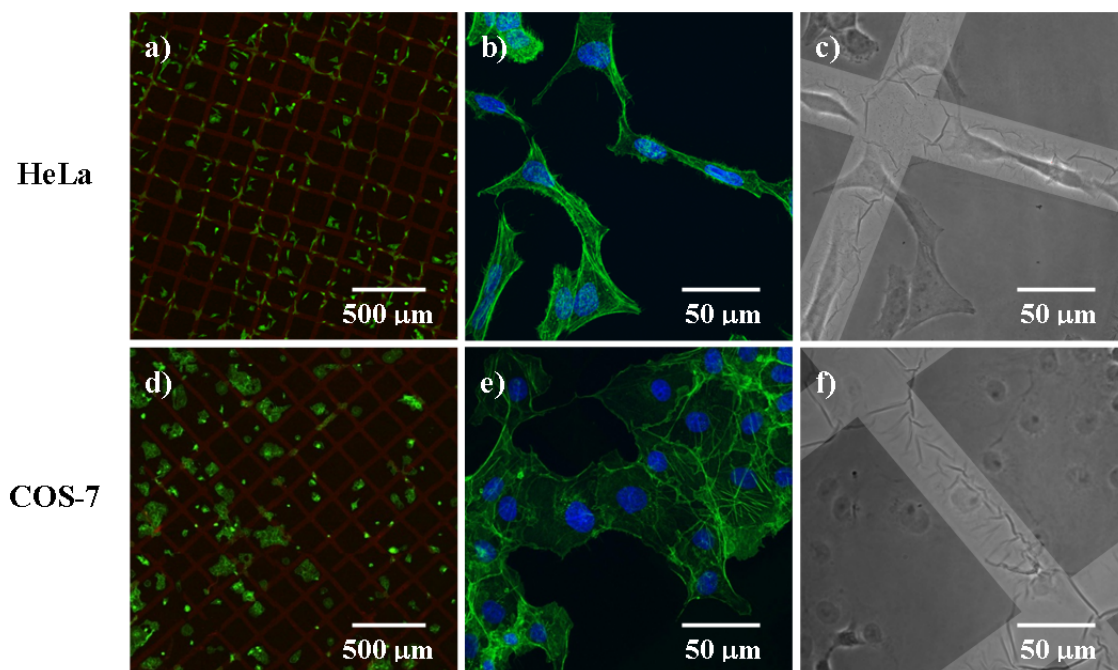


Fig. 11. Imágenes de microscopía confocal de un marcaje fluorescente de las fibras de actina con Alexa Fluor 488 y los núcleos con DAPI en células tumorales HeLa (a, b, c) y fibroblastos COS-7 (d, e, f) tras 72 h de cultivo sobre patrones del material polimérico H20. Las imágenes 7.a y 7.d son composiciones de imágenes para el mapeo de la muestra. Las imágenes 7.c y 7.f son las imágenes de contraste de fase de las imágenes 7.b y 7.e respectivamente; en estas imágenes de contraste de fase se ha añadido una banda sombreada en blanco para indicar la localización del material polimérico.

De estos resultados se concluye que el porcentaje de reticulación afecta al comportamiento de adhesión celular sobre el material polimérico. Para caracterizar mejor la adhesión selectiva de las células al vidrio **en los patrones poliméricos de H5**

se monitorizó el cultivo de las células tumorales HeLa sobre dichos sustratos. Se eligió esta línea celular porque, debido a su mayor movilidad,⁴⁶ tiene una mayor capacidad de deformación y mayor velocidad de migración, lo que permite ver más fácilmente la respuesta de la célula al interactuar con cada tipo de material (líneas poliméricas de H5 o sustrato de vidrio sin película). Estos estudios se realizaron cultivando las células en una cámara esterilizada y acondicionada, capturando imágenes de contraste de interferencia diferencial a diferentes tiempos en una misma posición del cultivo. En la figura 12 se puede observar que al iniciar el cultivo todas las células están en suspensión (no están adheridas al sustrato) por lo que muestran una morfología esférica. Se puede ver también como aquellas que están localizadas sobre la línea de material polimérico (marcada con una banda blanca) tienden a migrar hacia los laterales de la misma donde se encuentra el sustrato de vidrio sin material y donde por fin se adhieren adquiriendo una morfología extendida. Este comportamiento está en consonancia con las imágenes obtenidas por microscopia de fluorescencia confocal mostradas en la figura 10, en las que las células ocupan la zona con vidrio quedando las líneas poliméricas sin cubrir.

⁴⁶ Small, J.V., Anderson, K., Rottner, K. *Biosci. Rep.*, **1996**, 16, 351-368.

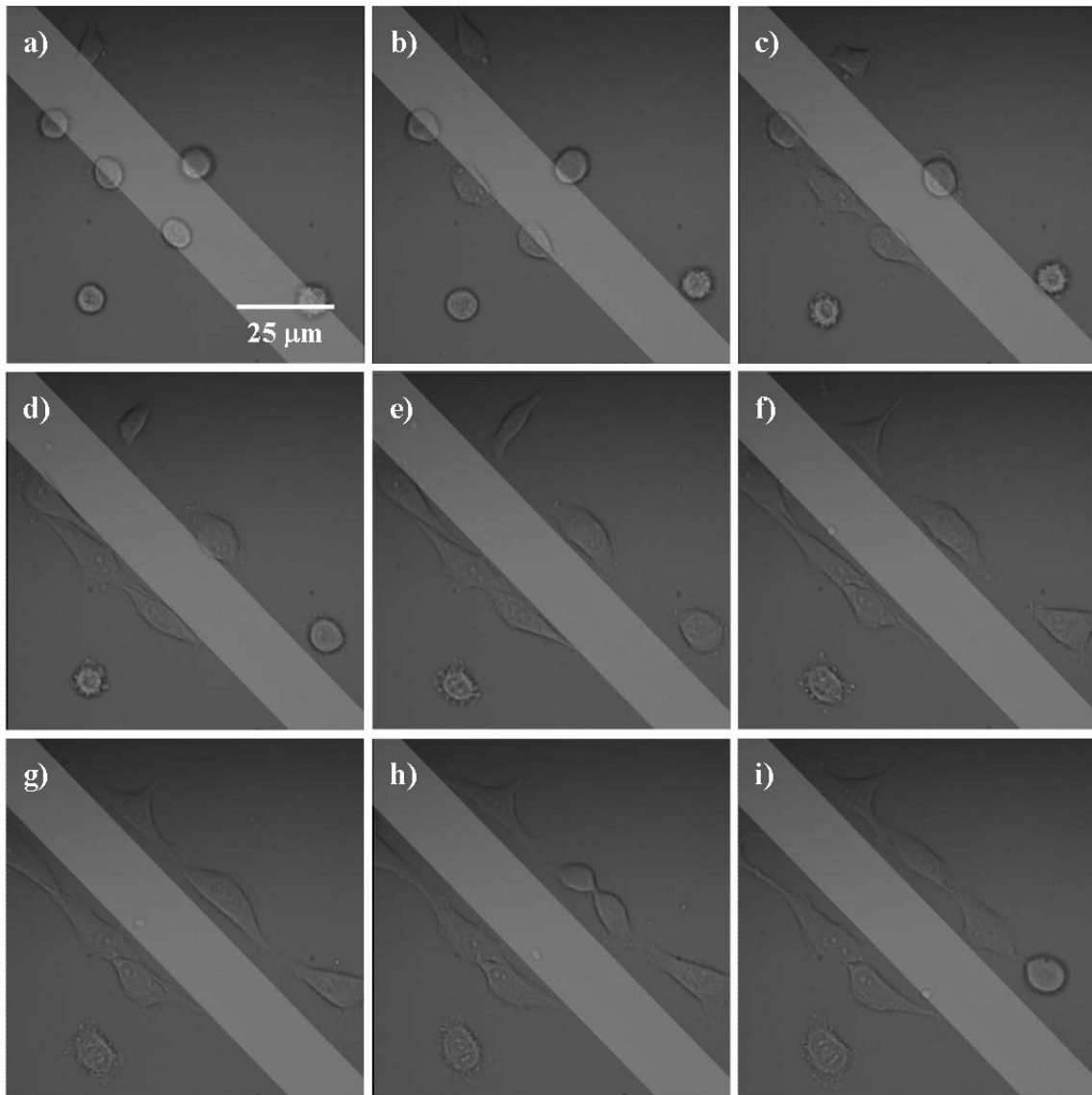


Fig. 12. Secuencia de imágenes de contraste de interferencia diferencial adquiridas para células tumorales HeLa cultivadas en patrones poliméricos de H5 sobre sustratos de vidrio. Se ha incluido una banda blanca en las imágenes para indicar la situación del material polimérico. El intervalo entre imágenes es de 2 h.

Con objeto de entender mejor el comportamiento de adhesión mostrado por las células en los patrones microestructurados, se cultivaron ambas líneas celulares (células tumorales HeLa y fibroblastos COS-7) sobre películas sin estructurar de los distintos materiales (H5, H20 y también sustratos de vidrio sin recubrir como referencia) a estas células se les realizó un **marcaje fluorescente de las fibras de vinculina** por un

procedimiento análogo al realizado en el marcaje de las fibras de actina. La vinculina es una proteína involucrada en los procesos de adhesión celular y suele acumularse en aquellos puntos donde la célula está interaccionando con el sustrato. De esta forma, el marcaje fluorescente de esta proteína (con Texas Red® como fluoróforo) permite visualizar los puntos de las células que están interaccionando con el correspondiente sustrato (H5, H20 o vidrio),⁴⁷ denominados puntos focales de adhesión. Como puede verse en la figura 13, ambas líneas celulares cultivadas en películas de H5 sin estructurar muestran cierta interacción con la superficie, lo que puede explicar los porcentajes de viabilidad celular (próximos al 100%) obtenidos en este material en el que las células han mostrado poca tendencia a adherirse cuando está estructurado. Sin embargo, las células adquieren una morfología esférica (figuras 13.a para células tumorales HeLa y 13.d para fibroblastos COS-7) y muestran tendencia a crecer en colonias en el caso de los fibroblastos COS-7 (figura 13.d). De esta forma consiguen minimizar la interacción con el material polimérico H5, lo que indica una baja afinidad de ambas líneas celulares por este material, en consonancia con los resultados obtenidos en las películas estructuradas.^{48, 49} En el vidrio, por su parte, las células adquieren una morfología extendida y establecen muchos más puntos focales de adhesión, representados por la sobreexpresión de vinculina y por tanto por una mayor intensidad de fluorescencia, que cuando son cultivadas sobre el sustrato de H5. Este hecho indica una mayor afinidad por el vidrio que por el sustrato polimérico lo que es acorde con la adhesión selectiva de las células a las zonas con vidrio en los patrones de H5. Esta adhesión selectiva al vidrio en las estructuras poliméricas de H5 se ve favorecido además por la alta capacidad de migración de las células sobre sustratos con los que interaccionan débilmente como es el caso del material H5.⁴

⁴⁷ Ziegler, W.H., Liddington, R.C., Critchley, D.R. *Trends Cell Biol.*, **2006**, *16*, 453-460.

⁴⁸ Owen, G.R., Meredith, D.O., Gwynn, I., Richards, R.G. *Eur. Cells Mater.*, **2005**, *9*, 85-96.

⁴⁹ Geiger, B., Spatz, J.P., Bershadsky, A.D. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 21-33.

Cuando las células se cultivan sobre películas sin estructurar de H20 (figuras 13.b para células tumorales HeLa y 13.e para fibroblastos COS-7), material en el que no mostraban esta adhesión preferente al vidrio en los patrones microestructurados, se adhieren con una morfología más extendida que en las películas de H5. Esta morfología es similar a su morfología típica en los sustratos de vidrio (figuras 13.c para células tumorales HeLa y 13.f para fibroblastos COS-7), que es un sustrato adherente para ellas. Esto indica una mayor afinidad por el material más reticulado (H20) que por el material menos reticulado (H5).

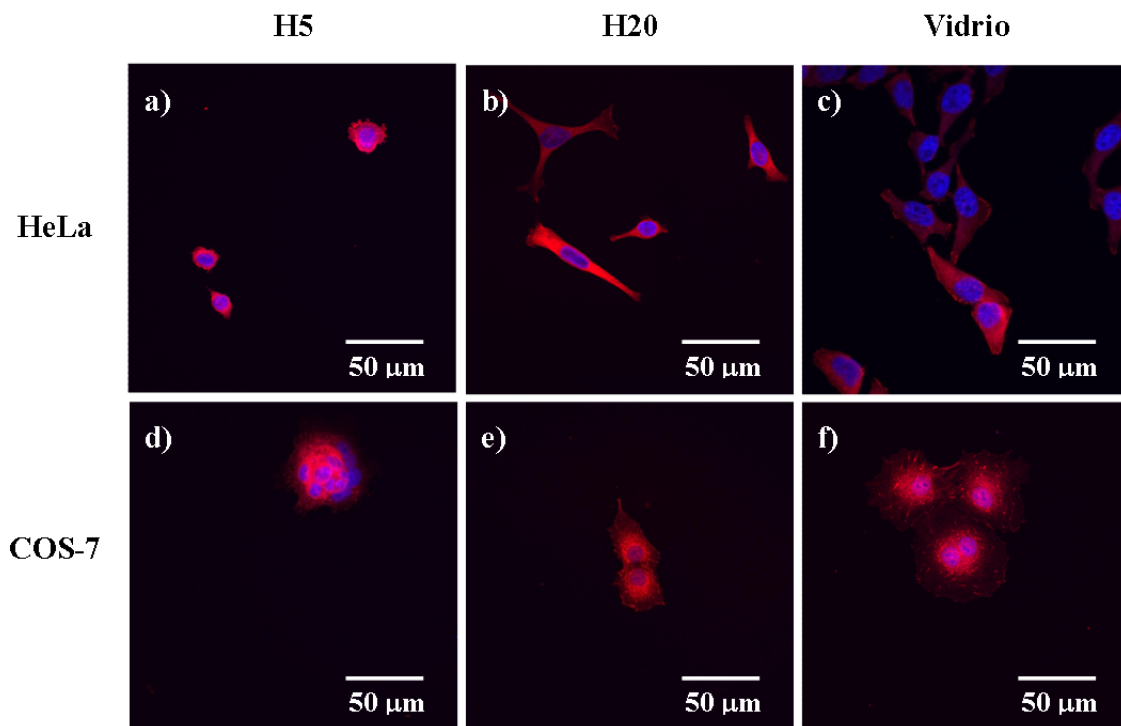


Fig. 13. Imágenes de microscopía confocal de un marcaje fluorescente de las fibras de vinculina con Texas Red y los núcleos con DAPI en células tumorales HeLa (a, b, c) y fibroblastos COS-7 (d, e, f) tras 72 h de cultivo sobre películas de H5 (a, d) y H20 (b, e) sin estructurar y sobre sustratos de vidrio (c, f).

La morfología esférica de las células en películas fotorreticuladas de H5 sin estructurar se caracterizó también por **microscopía electrónica de barrido** (*Scanning*

Electron Microscopy - SEM) para ambas líneas celulares una vez cultivadas y fijadas (esta vez con glutaraldehído). Cuando las células se cultivan sobre sustratos de vidrio (control), que es un sustrato adherente para ellas, extienden su citoplasma para establecer más puntos focales de adhesión como se observa en las figuras 14.b para células tumorales HeLa y 14.d para fibroblastos COS-7. Estos resultados están en consonancia con los observados en el marcaje fluorescente con vinculina (figuras 13.c para células tumorales HeLa y 13.f para fibroblastos COS-7). Sin embargo, cuando se cultivan las células sobre películas de H5 se observa una morfología esférica (figuras 14.a para células tumorales HeLa y 14.c para fibroblastos COS-7), tal y como se había observado también en los estudios de inmunomarcaje (figuras 13.a para células tumorales HeLa y 13.d para fibroblastos COS-7). Tal y como puede verse por las dimensiones de las células, esta morfología esférica sobre el material polimérico H5 consigue reducir la interacción con el material, comportamiento típico de las células en sustratos por los que siente poca afinidad.

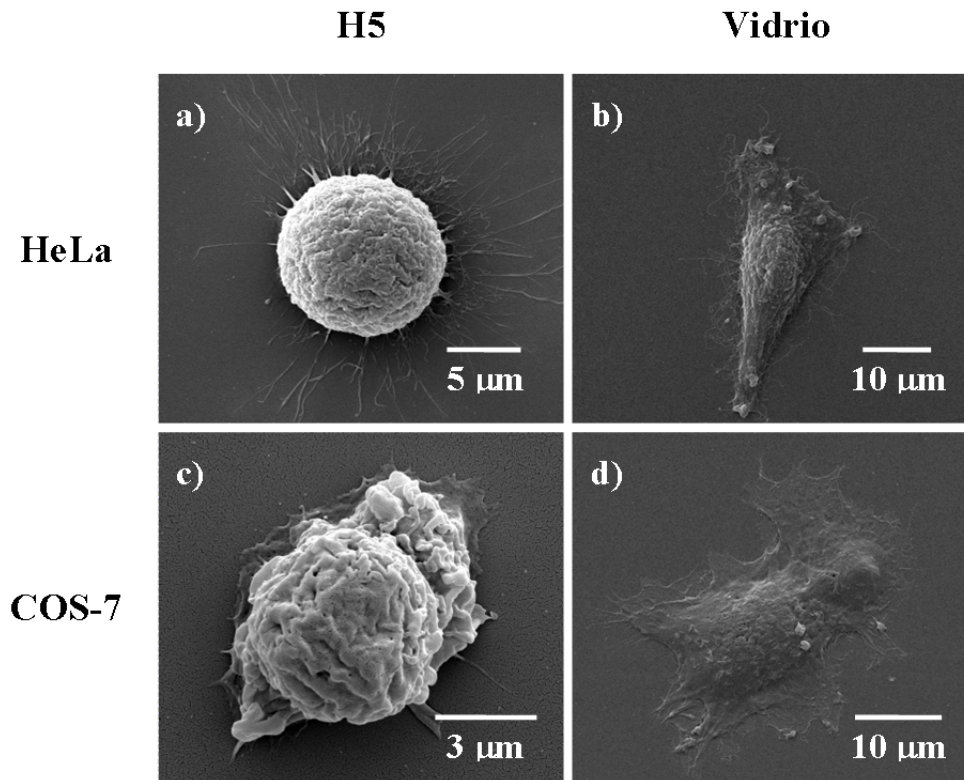


Fig. 14. Imágenes de SEM de células tumorales HeLa (a, b) y fibroblastos COS-7 (c, d) cultivados sobre películas de H5 (a, c) sin estructurar y sobre sustratos de vidrio (b, d).

La menor afinidad de las células por el material polimérico H5 podría estar relacionada con la hidrofilia del material, ya que se ha descrito en la bibliografía que las células no se adhieren bien sobre superficies hidrófilas como algunas basadas en ácido hialurónico.⁵⁰ En las muestras de H20, con mayor cantidad de reticulante (hidrófobo tras la descomposición de los grupos diazonio), y con mayor grado de reticulación, es de esperar una disminución en la capacidad del material para absorber agua, lo que llevaría a un carácter más hidrófobo que en el caso de H5. Esto podría explicar la mejor adhesión de las células en H20 que en H5.

⁵⁰ Wang, Y.W., Wu, Q., Chen, G.Q. *Biomaterials*, **2003**, 24, 4621-4629.

El cambio de morfología observado en células cultivadas sobre películas poliméricas de H5 podría estar relacionado no solamente con un cambio en la adhesión celular, sino también con una desregularización del **ciclo de vida celular** que podría, en células sanas, dar lugar a la formación de tumores.⁵¹ Además, la morfología esférica también es típica de las células apoptóticas (células en proceso de muerte).⁵² En consecuencia, para descartar posibles desregularizaciones del ciclo o apoptosis se analizó el ciclo de vida celular mediante citometría de flujo para ambas líneas celulares cultivadas en sustratos poliméricos de H5 fotorreticulado sin estructurar y sobre vidrio (como control de una población celular normal).

En este tipo de estudios se cultivan las células sobre el sustrato correspondiente (H5 y también vidrio como referencia) y posteriormente se sueltan del sustrato utilizando tripsina que es una enzima utilizada para romper las uniones de las células entre ellas mismas o con el sustrato al que están adheridas. A continuación se tiñe el material genético de las células con un marcador fluorescente y se realiza un conteo del número de células (eje Y) que tienen una determinada cantidad de fluorescencia (eje X), y por lo tanto una determinada cantidad de material genético. De esta forma se puede distinguir aquellas células en fase de reposo con una determinada cantidad de material genético, y que por lo tanto han incorporado una cierta cantidad de marcador fluorescente, de aquellas que se están dividiendo, con doble cantidad de material genético y por lo tanto con doble cantidad de marcador fluorescente. Las células en fase de síntesis de ADN previa a la división celular tendrán una cantidad de ADN intermedio entre los dos estados anteriores. En las gráficas obtenidas en este tipo de análisis (figura 15) normalmente se observan dos picos para una población celular normal. El pico

⁵¹ Mahmoudi, M., Azadmanesh, K., Shokrgozar, M.A., Journeay, W.S., Laurent, S. *Chem. Rev.*, **2011**, *111*, 3407-3432.

⁵² Willingham, M.C. *J. Histochem. Cytochem.*, **1999**, *47*, 1101-1109.

principal corresponde a las células en fase G_0 - G_1 (células en reposo) y el otro pico, que se asigna a las células en fase G_2 - M (células en división), aparece al doble de intensidad de fluorescencia (eje X) debido a que contienen el doble de material genético justo antes de la división celular.⁵¹ Entre estos dos picos hay un continuo que se atribuye a las células en fase de síntesis del ADN (fase S) y que contienen diferentes cantidades de ADN. Las células apoptóticas pueden ser también identificadas en estos gráficos porque pierden material genético y aparecen en otro pico a una intensidad de fluorescencia menor que el pico G_0 - G_1 (conocido como pico sub G_0 - G_1).⁵³ Mediante deconvolución de los picos principales (células apoptóticas en caso de que las haya, células en fase G_0 - G_1 y células en fase G_2 - M) se puede conocer el porcentaje de células en cada estado y, por diferencia, el porcentaje de células en fase S.

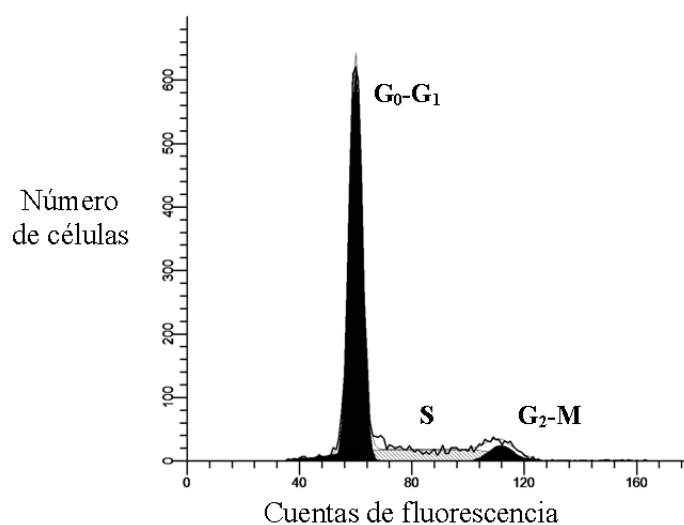


Fig. 15. Gráfica obtenida en un análisis del ciclo celular por citometría de flujo en una población de células HeLa cultivadas sobre películas poliméricas de H5. En el eje X se representa la intensidad de fluorescencia (proporcional al material genético que contiene la célula) y en el eje Y se representa el número de células que dan esa cantidad de fluorescencia. Las áreas en negro representan la deconvolución de los picos G_0 - G_1 y G_2 - M respectivamente.

⁵³ Mahmoudi, M., Simchi, A., Vali, H., Imani, M., Shokrgozar, M.A., Azadmanesh, K., Azari, F. *Adv. Eng. Mater.*, **2009**, *11*, B243.

Tal y como puede verse en la tabla 1, el porcentaje de células tumorales HeLa en la fase S es menor cuando éstas son cultivadas sobre películas poliméricas de H5 que cuando son cultivadas sobre sustratos de vidrio. Por el contrario, el porcentaje de células tumorales HeLa en fase G_0-G_1 es mayor en sustratos de H5 que en sustratos de vidrio. Este dato revela que el material H5 provoca una modificación en la síntesis del DNA en las células tumorales HeLa, hecho que no afecta a la velocidad de división celular ya que el porcentaje de células en la fase G_2-M es similar cuando las células tumorales HeLa son cultivadas sobre películas de H5 o sobre sustratos de vidrio. Este dato es consistente con los datos de viabilidad celular obtenidos en los ensayos de MTT en los que se mostraba una viabilidad celular similar en ambos tipos de sustratos. Para los fibroblastos COS-7, estudiados como modelo de línea celular sana, puede verse en la tabla 1 que el porcentaje de células en cada fase del ciclo es similar cuando éstos son cultivados en películas de H5 o en sustratos de vidrio. Esto indica que no hay desregularización del ciclo celular para este tipo de células sanas, lo cual es consistente con los estudios de viabilidad celular obtenidos en los ensayos de MTT.

Tabla 1. Porcentajes de células en las distintas fases del ciclo celular para células tumorales HeLa y fibroblastos COS-7 cultivados durante 24 h sobre películas poliméricas de H5 y sobre sustratos de vidrio (control).

	G₀-G₁ [%]	S [%]	G₂-M [%]	G₂-M / G₀-G₁ [%]
HeLa (H5)	75.03	19.14	5.83	0.08
HeLa (vidrio control)	57.77	35.51	6.61	0.11
COS-7 (H5)	47.31	37.77	14.92	0.32
COS-7 (vidrio control)	48.10	39.29	12.61	0.26

Además no se ha encontrado pico subG₀-G₁ en ninguna de las dos líneas estudiadas (ni en sustratos de vidrio ni en las películas de material polimérico H5) lo que indica la ausencia de células apoptóticas y confirma la hipótesis de no citotoxicidad obtenida mediante los ensayos de MTT. Por lo tanto puede concluirse que el material polimérico H5 consigue modificar el comportamiento de adhesión celular sin afectar al ciclo celular en el caso de los fibroblastos COS-7 (usados como modelo de células sanas) ni provocar muerte de las células.

4.3. RESUMEN

La reacción de descomposición fotoinducida de sales de diazonio se ha utilizado para generar biomateriales por reticulación del hialuronato de sodio. Esta reacción también se ha utilizado para la reticulación de heparina. Estos procesos de

fotorreticulación han sido estudiados mediante espectroscopias UV-Vis e IR comprobándose el proceso de reticulación con ambos polímeros sin necesidad de modificarlos químicamente.

Se ha estudiado la proliferación de dos líneas celulares distintas (células tumorales HeLa y fibroblastos COS-7 como línea celular sana) sobre películas del ácido hialurónico reticulado con dos cantidades distintas de reticulante (5% y 20% en peso respectivamente). De estos estudios se concluye que ninguno de los dos materiales es tóxico para las células.

Se han generado estructuras bidimensionales de geometría controlada mediante escritura directa con láser tanto para H5 como para H20. Estas estructuras han sido utilizadas para llevar a cabo estudios de adhesión celular en los que se ha visto que ambas líneas celulares se adhieren selectivamente al vidrio en estructuras de H5 soportadas sobre sustratos de vidrio, lo que se atribuye a una menor afinidad de las células por el material polimérico que por el vidrio. En estructuras de H20, sin embargo, no se observa esta adhesión selectiva en el vidrio y las células adoptan una morfología extendida en películas sin estructurar, lo que concuerda con una mayor afinidad respecto al material menos reticulado (H5). La menor afinidad de las células al ser cultivadas sobre sustratos de H5 que sobre sustratos de H20 podría estar relacionada con un menor grado de entrecruzamiento del material H5 que determina un carácter más hidrófilo responsable de que las células adopten una morfología esférica.

El cambio de morfología observado en las células cultivadas sobre películas sin estructurar de H5 va asociado a una ligera modificación del ciclo celular en el caso de las células tumorales HeLa que ralentizan la síntesis de DNA. Para la línea celular sana (COS-7) no se observa ninguna alteración del ciclo celular. Esto hace que, en este tipo

de células sanas, las propiedades del material se puedan modificar controlando la cantidad de agente reticulante, sin que ello afecte al ciclo celular de los fibroblastos COS-7.

4.4. EXPERIMENTAL

4.4.1. MATERIALES

Como polímeros naturales se han utilizado el hialuronato de sodio ($M_w \approx 1000000$ Da) y la heparina ($M_w \approx 30000$ Da) suministrados por Acros Organics. Estos polímeros fueron usados sin necesidad de tratamiento previo.

Como reticulante se ha utilizado la sal de diazonio trifuncional cloruro de N,N,N-tris((4-diazofenil)amina), que fue preparada tal y como se describe en el apartado 3.4.2 del capítulo 3.

Los estudios celulares se llevaron a cabo con células tumorales HeLa y con fibroblastos COS-7 (*African Green Monkey SV40-transfected kidney fibroblasts*). Las células HeLa fueron donadas por el Hospital Puerta de Hierro (Madrid, España), mientras que los fibroblastos COS-7 fueron suministrados por la compañía ATCC.

Para realizar los cultivos celulares se utilizó *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM; Lonza) como medio de cultivo, que fue suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF), 1% de glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera controlada de CO₂ al 5% sobre cubreobjetos redondos de vidrio de 12 mm de diámetro (Marienfeld GmbH).

Para los estudios de biocompatibilidad se utilizó bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) suministrado por Invitrogen, que se disolvió en una disolución tampón fosfato (PBS) con una concentración de 5 mg/mL. Esta disolución fue añadida al cultivo en una relación 1:20 (50 μ L de MTT en PBS y 950 μ L de medio de cultivo).

Para el marcaje fluorescente del citoesqueleto celular se utilizó una disolución de formaldehído (Sigma-Aldrich) al 4% en PBS con 1% de sacarosa como tampón de fijación. El tampón de permeabilización fue preparado disolviendo 10.3 g de sacarosa (Sigma-Aldrich), 0.292 g de NaCl (Panreac), 0.06 g MgCl₂ hexahidratado (Panreac) y 0.476 g de Hepes (Sigma-Aldrich) en 100 mL de PBS. El pH de esta disolución fue ajustado a 7.2 para finalmente añadir 0.5 mL de Tween 20 (Panreac) en 100 mL de PBS. El tampón de bloqueo se preparó disolviendo 1 g de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma-Aldrich) en 100 mL de PBS, mientras que el tampón de lavado se preparó disolviendo 0.5 mL de Tween 20 (Panreac) en 100 mL de PBS.

Para el marcaje de vinculina se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-humano IgG1 crecido en ratones (Sigma-Aldrich) como anticuerpo primario, y un anticuerpo monoclonal anti-ratón biotinilado (IgG) de Vector Laboratories como anticuerpo secundario. Como marcador fluorescente se utilizó estreptavidina conjugada con el fluoróforo Texas Red, de Vector Laboratories. Para el marcaje de actina se utilizó faloidina conjugada con Alexa Fluor 488 que fue proporcionada por Invitrogen. Todas estas disoluciones fueron diluidas 1:50 en el tampón de bloque de BSA antes de la incubación. Para el marcaje del núcleo celular se utilizó 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) como marcador fluorescente. El DAPI fue disuelto en PBS (5 mg/mL) y diluido 10⁴ veces antes de la incubación con las células. Para montar las muestras sobre el

portaobjetos se utilizó el medio de montaje Prolong[®] Gold Antifade Reagent de Invitrogen.

Para la caracterización morfológica de las células mediante SEM se utilizó una disolución al 2.5% de glutaraldehído (Sigma-Aldrich) en PBS como tampón de fijación. Las muestras se deshidrataron utilizando disoluciones de etanol / H₂O con porcentajes crecientes de EtOH cuyas composiciones fueron 25%, 50%, 70%, 90% y 100% de EtOH respectivamente.

4.4.2. PREPARACIÓN DE PELÍCULAS FOTORRETICULABLES

Para la preparación de películas fotorreticulables se añadió la cantidad correspondiente del agente reticulante, generado *in situ* tal y como se describe en el apartado 3.4.2 del capítulo 3, sobre una disolución de hialuronato de sodio en agua Milli-Q. Se prepararon formulaciones con hialuronato de sodio con un 5% y un 20% en peso del reticulante que fueron codificadas como H5 y H20 respectivamente. En el caso de la heparina se prepararon formulaciones con un 30% en peso de la heparina que se codificaron como Hep-30

Estas disoluciones se utilizaron para preparar películas por *spin coating* (un ciclo de 1000 rpm durante 5 s y otro ciclo de 3000 rpm durante 180 s) utilizando sustratos de vidrio limpiados mediante un tratamiento con ozono. Para la caracterización espectroscópica por absorción UV-Vis se utilizaron sustratos de vidrio previamente tratados con ozono durante unos minutos. Para la caracterización por IR se utilizaron sustratos de fluorita (CaF₂). Para los estudios celulares, las películas fotorreticulables se prepararon sobre cubreobjetos de vidrio redondos de 12 mm de diámetro, que también fueron previamente tratados con ozono.

4.4.3. PROCESO DE FOTORRETICULACIÓN

Para los estudios de caracterización por espectroscopia UV-Vis e IR, los ensayos de viabilidad celular, los estudios del ciclo celular por citometría de flujo y los estudios de morfología por SEM se llevó a cabo un proceso de fotocurado de toda la película empleando para ello una lámpara de Hg de 300 W (Oriel, modelo #6286; portalámparas de Oriel, modelo #66902) conectada a un filtro reflectante de luz UV (Oriel, Model #66218). Estas muestras fueron irradiadas durante 2 min con luz UV con una intensidad de 160 mW/cm^2 en el intervalo de longitudes de onda de 350-450 nm, tal y como se describe en el capítulo anterior. Para los estudios de adhesión celular se utilizaron estructuras de geometría controlada generadas por DLW. La fuente de luz en los experimentos de DLW fue un haz de luz láser de 1.7 mm de diámetro y 1.75 mW focalizado sobre la muestra con un objetivo de microscopio para luz UV de 39 aumentos. La muestra se desplazó en el plano horizontal mediante una plataforma XY motorizada y controlada por ordenador para generar las líneas de material fotorreticulado. Una vez se ha llevado a cabo la reticulación fotoinducida se realiza un lavado con una disolución acuosa de NaOH 0.06 M, un reflujo de agua destilada y finalmente un secado con aire comprimido.

4.4.4. ESTUDIOS DE BIOCMPATIBILIDAD

Los estudios de biocompatibilidad se llevaron a cabo mediante ensayos de toxicidad con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) sobre poblaciones de células tumorales HeLa o fibroblastos COS-7 cultivadas sobre películas de material fotorreticulado depositadas sobre vidrios redondos de 12 mm de diámetro. Estas películas fueron esterilizadas con etanol al 70% durante 15 min y posteriormente

lavadas con PBS estéril durante otros 15 min antes de cultivar las células. A continuación se cultivaron las células durante 24, 48 y 72 h respectivamente en placas de 24 pocillos y con una densidad de 50000 células en 1 mL de medio de cultivo. Una vez cultivadas el tiempo deseado, el sustrato de vidrio con la película de material, con las células ancladas en su superficie, fue transferido a otra placa de 24 pocillos, donde se incubó durante 4 h en oscuridad con una disolución de MTT diluido en medio de cultivo fresco. Tras el periodo de incubación, el medio fue retirado y los cristales de formazán generados fueron disueltos en 1 mL de DMSO. A continuación, 200 μ L de esta disolución morada fueron trasvasados a una placa de cultivo de 96 pocillos para llevar a cabo las medidas de absorbancia a 570 nm en un lector de placas Biotek ELX800. El lector de placas se calibra tomando como cero la absorbancia de 200 μ L de DMSO.

Los porcentajes de viabilidad celular, relativos a un control llevado a cabo sobre sustratos de vidrio, fueron calculados mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{[A]_{test}}{[A]_{control}} \times 100 \quad (\text{ec. 1})$$

Cada experimento fue repetido con 5 muestras para obtener el valor medio y la desviación estándar.

4.4.5. ESTUDIOS DE ADHESIÓN CELULAR

Los estudios de adhesión celular se llevaron a cabo cultivando las células sobre patrones de geometría controlada generadas por DLW. Estos sustratos fueron previamente esterilizados con EtOH 70% durante 15 min y lavados con PBS estéril

durante otros 15 min. El cultivo se realizó en placas de 24 pocillos con una densidad de 10000 células en 1 mL de medio de cultivo.

Tras el tiempo de cultivo deseado, las células adheridas a estos sustratos de vidrio con estructuras poliméricas fueron fijadas con tampón de fijación a 37°C durante 15 min. A continuación las muestras fueron lavadas con PBS y se incubaron con tampón de permeabilización a 4°C durante 5 min y posteriormente con tampón de bloqueo durante otros 5 min a 37°C. Para el marcaje de vinculina, a continuación se añadió el anticuerpo primario de vinculina y se incubó durante 1 h a 37°C. Las muestras se lavaron con tampón de lavado para posteriormente incubarlas con el anticuerpo secundario durante 1 h a 37°C. Tras otro proceso de lavado, se incubaron con el marcador de estreptavidina conjugada con el fluoróforo Texas Red durante 30 min a 4°C, seguido de otro proceso de lavado. Para el marcaje de actina, tras la etapa de permeabilización se incubaron las células con faloidina (marcada con Alexa Fluor 488) durante 1 h a 37°C. Por último, las células fueron incubadas con DAPI durante 5 min a temperatura ambiente, lavadas con agua destilada y montadas sobre el portaobjetos con medio de montaje Prolong® Gold Antifade Reagent.

Para los experimentos de microscopía secuencial, los sustratos fueron esterilizados con EtOH 70% durante 15 min y lavados con PBS estéril durante otros 15 min. A continuación fueron fijados con fibronectina en una placa Petri de cultivo celular (*μ-Dish* para cultivo celular de Ibidi) y se dejó secar durante unas horas en un ambiente estéril. Las células se cultivaron durante 24 h en una cámara a 37°C y 5% CO₂ acoplada al microscopio y en una densidad de 50000 células HeLa en 1 mL de medio de cultivo. Durante este tiempo, se adquirieron imágenes de contraste de interferencia diferencial cada 15 min en diversos puntos de la muestra.

Para la caracterización morfológica de las células por microscopía electrónica de barrido se cultivaron las células (células tumorales HeLa o fibroblastos COS-7) sobre películas de H5 fotorreticuladas sin estructurar o sobre sustratos de vidrio. Ambos tipos de sustratos fueron previamente esterilizados con etanol 70% durante 15 min y lavados con PBS estéril durante otros 15 min. El cultivo se realizó en placas de 24 pocillos con una densidad de 20000 células en 1 mL de medio de cultivo.

Tras el tiempo de cultivo deseado, las células adheridas a la película polimérica o al sustrato de vidrio fueron fijadas con el tampón de fijación con un 2.5 % de glutaraldehído a 4°C durante 1 h. A continuación las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS a 4°C durante 20 min y otras 3 veces con agua destilada a 4°C durante 20 min. El proceso de deshidratación se llevó a cabo por sucesivos lavados a 4°C durante 10 min con etanol al 25%, 50%, 70%, 90% y 100% (el lavado con etanol al 100% fue repetido dos veces). Finalmente las muestras fueron cubiertas con un depósito de oro de aproximadamente 15 nm de espesor para obtener una muestra conductora.

Los estudios del ciclo celular se llevaron a cabo por citometría de flujo. Estos estudios fueron llevados a cabo cultivando las células sobre películas de H5 fotorreticuladas sin estructurar o sobre sustratos de vidrio (como control). El cultivo se realizó en placas de 24 pocillos con una densidad de 100000 células en 1 mL de medio de cultivo. Tras 24 h de cultivo, los sustratos fueron transferidos a otra placa de 24 pocillos donde se soltaron las células mediante una incubación con 100 μ L de tripsina (2 min a 37°C y 5% CO₂) que fue neutralizada a continuación con 1 mL de medio de cultivo completo (este experimento fue repetido en 20 muestras). Las células obtenidas en todas las muestras se juntaron y se centrifugaron a 300 g durante 7 min. El medio de cultivo sobrenadante fue decantado y las células se resuspendieron en 200 μ L de PBS para ser fijadas con EtOH frío (-20°C) durante una noche a 4°C. A continuación las

células se centrifugaron a 300 g durante 7 min, se lavaron con 500 μ L de PBS y se centrifugaron otra vez a 300 g durante 7 min. Finalmente las células fueron teñidas con 1 mL de la disolución marcadora (50 μ g/mL de yoduro de propidio y 100 μ g/mL de RNAsa en PBS) durante 30 min en oscuridad y a temperatura ambiente.

4.4.6. TÉCNICAS

Las películas fotorreticulables fueron preparadas utilizando el *spin coater* Karl-Suss CT60 tal y como se describió en el capítulo 3. La caracterización espectroscópica del proceso de irradiación y la caracterización topográfica de las películas y patrones obtenidos también se llevaron a cabo con los instrumentos descritos en el capítulo 3. Las medidas de absorbancia en los ensayos de MTT se realizaron en un espectrofotómetro de placas Biotek ELX800.

Para los estudios de adhesión, las secciones teñidas con marcadores fluorescentes se visualizaron en un microscopio confocal Olympus FV10i con un objetivo de 60 aumentos con aceite de inmersión (lentes UPLSAPO 60x con apertura numérica 1.35) con una resolución de 1024x1024 píxeles y un *pinhole* de 1 unidad. Para el visionado completo de la muestra (imagen mapa) que se utiliza para localizar el punto a observar con el objetivo de 60 aumentos, se utilizó un objetivo de microscopio de 10 aumentos (lentes UPLSAPO 10x con apertura numérica 0.4) con el que se adquirió un campo de 7x7 imágenes que se combinaron en una imagen mapa.

Para la microscopía secuencial, las células fueron cultivadas en placas Petri de cultivo celular (μ -Dish para cultivo celular de Ibidi). Las fotografías fueron registradas durante 24 h usando un microscopio Leica AF6000 LX con una cámara que proporciona

CAPITULO 4

una atmósfera a 37°C y 5% CO₂ para el cultivo celular. El objetivo utilizado fue un objetivo 40x HCX PL S-APO de contraste de interferencia diferencial. Las imágenes fueron tomadas con una cámara CCD (Model Orca 9100-02; Hamamatsu) a intervalos de 15 min y registradas como conjuntos de imágenes usando un software LAS AF (Leica Microsystems). Las imágenes fueron procesadas usando este mismo software.

Las imágenes de SEM se tomaron usando un microscopio de barrido electrónico Inspect F50 trabajando a alto vacío ($< 6 \cdot 10^{-4}$ Pa) con un voltaje de aceleración de 200 V a 30 kV. Los estudios del ciclo celular se llevaron a cabo mediante citometría de flujo en un citómetro FACSCARRAY de BD y los datos fueron analizados con el software Modfit 3.0 de Verity Software.

***5. FOTORRETICULACIÓN DE
POLIÉSTERES ALIFÁTICOS
CON UNA SAL DE DIAZONIO
TRIFUNCIONAL***

*(parte de los resultados de este capítulo han sido enviados a la revista
Reactive and Functional Polymers)*

5.1. INTRODUCCIÓN

En esta tesis doctoral se está estudiando la aplicación de reacciones de dos grupos funcionales, como la fotodescomposición de sales de diazonio, que permiten la fotorreticulación de polímeros sin que se formen dichas cadenas. Como continuación del capítulo anterior, en este capítulo se va a utilizar el reticulante descrito en el capítulo 3 para la generación de biomateriales a partir de polímeros sintéticos. Este tipo de polímeros pueden ser degradados si contienen enlaces hidrolíticamente lábiles como grupos éster, amida o carbonato por ejemplo.¹ Además muestran una gran versatilidad sintética que permite optimizar sus propiedades para la aplicación deseada.² Entre la variedad de polímeros sintéticos disponibles se ha seleccionado una familia de poliésteres alifáticos ya que son polímeros biodegradables y biocompatibles ampliamente utilizados en aplicaciones biomédicas.^{3,4} Concretamente, los poliésteres seleccionados están basados en el poliéster hiperramificado Boltorn^{®5} que tiene una estructura hiperramificada y presenta, por lo tanto, un gran número de grupos hidroxilo terminales (figura 1). Estos grupos hidroxilo permiten la reacción directa del polímero con el reticulante trifuncional basado en sales de diazonio, a la vez que la estructura hiperramificada del polímero va a favorecer la formación de una red polimérica entrecruzada. En este capítulo se va a estudiar además la funcionalización de los polímeros seleccionados con grupos sulfonato (figura 1), que también pueden reaccionar con las sales de diazonio y que permiten obtener materiales con distintas propiedades fisico-químicas que los obtenidos por reticulación de los polímeros con grupos hidroxilo.

¹ Nair, L.S., Laurencin, C.T. *Prog. Polym. Sci.*, **2007**, *32*, 762-798.

² Shoichet, M.S. *Macromolecules*, **2010**, *43*, 581-591.

³ Seyednejad, H., Ghassemi, A.H., van Nostrum, C.F., Vermonden, T., Hennink, W.E. *J. Control. Rel.*, **2011**, *152*, 168-176.

⁴ Tian, H., Tang, Z., Zuang, X., Chen, X., Jing, X. *Prog. Polym. Sci.*, **2012**, *37*, 237-280.

⁵ Zagar, E., Zigon, M. *Prog. Polym. Sci.*, **2011**, *36*, 53-88.

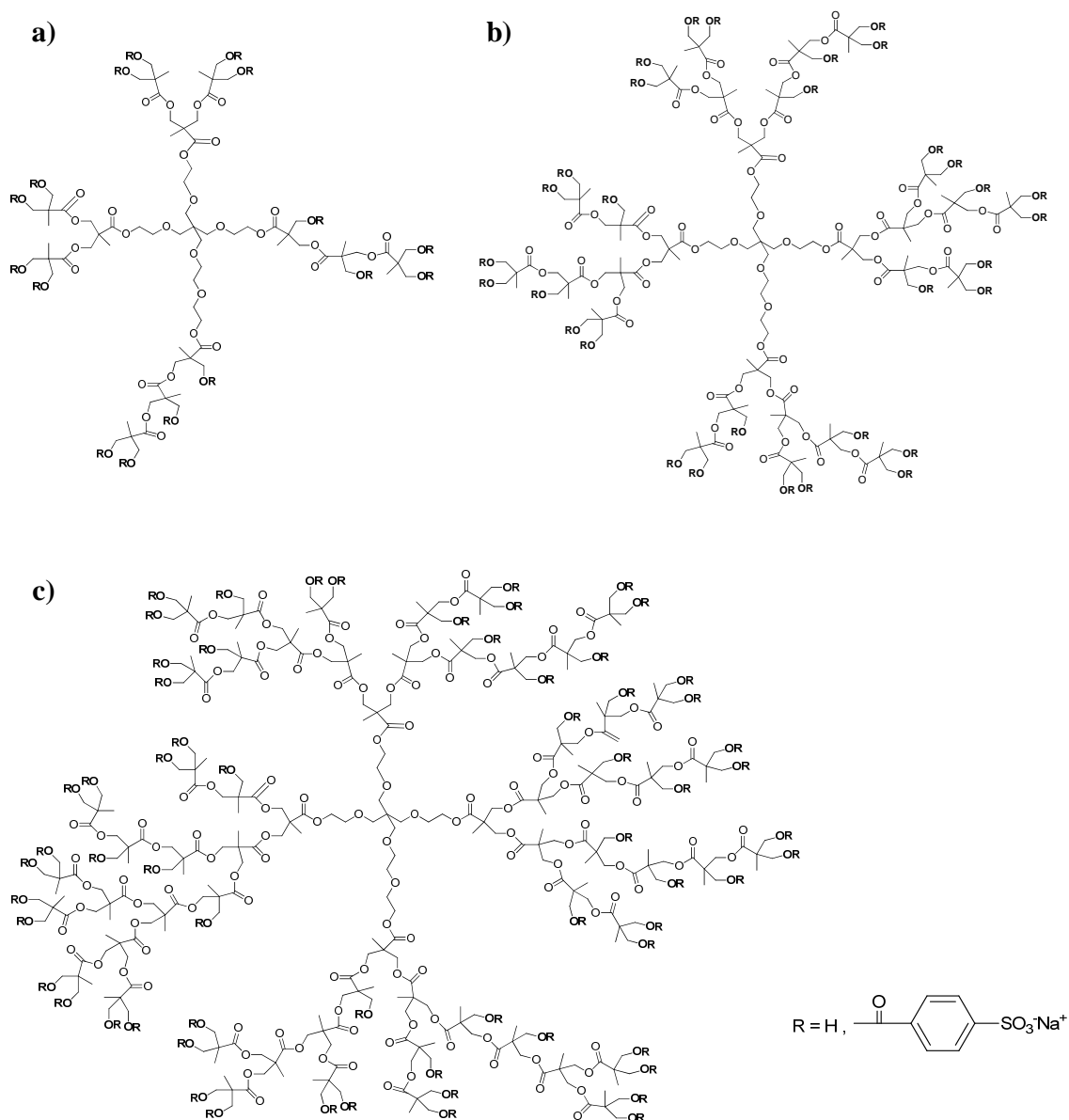


Fig. 1. Estructuras químicas de los poliésteres de segunda (a), tercera (b) y cuarta (c) generación, que contienen respectivamente 16, 32 y 64 grupos funcionales en promedio (hidroxilo y/o sulfonato). Los poliésteres comerciales fueron codificados como HB16OH, HB32OH y HB64OH respectivamente. Los poliésteres funcionalizados con grupos sulfonato fueron codificados como HB16S, HB32S y HB64S respectivamente.

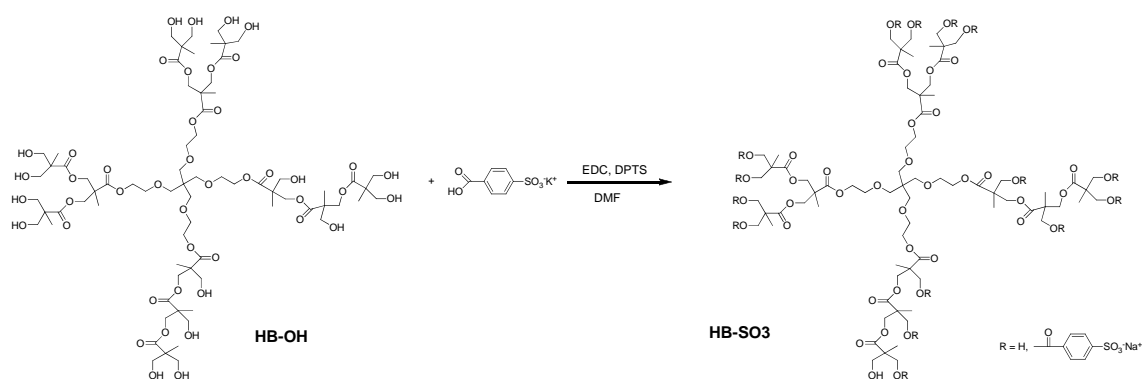
Al igual que en el capítulo 4, se estudiará la biocompatibilidad de los materiales resultantes con células tumorales HeLa y fibroblastos COS-7 como modelo de línea

celular sana. Se llevará a cabo también la preparación de patrones poliméricos sobre vidrio para estudiar la adhesión de las células en este tipo de sustratos.

5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.2.1. SÍNTESIS DE LOS POLIÉSTERES HIPERRAMIFICADOS CON GRUPOS SULFONATO

La funcionalización de los poliésteres hiperramificados comerciales con grupos sulfonato se llevó a cabo por esterificación de Steglich de los grupos hidroxilo terminales con la sal de potasio del ácido 4-hidroxicarbonilbencensulfónico utilizando cloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida como agente de condensación y la sal p-toluensulfonato de 4-dimetilaminopiridinio (DPTS) como catalizador (esquema 1). Tras la reacción, la disolución se dializó frente a una disolución saturada de cloruro de sodio (NaCl) para desplazar los cationes 4-(dimetilaminopiridinio) de su interacción con los grupos sulfonato en los polímeros funcionalizados, y a continuación se dializó frente a agua destilada para eliminar el exceso de NaCl.



Esquema 1. Funcionalización de los grupos hidroxilo del poliéster hiperramificado de 2ª generación y 16 grupos hidroxilo promedio (HB16OH) con la sal de potasio del ácido 4-hidroxicarbonilbencensulfónico.

Este proceso se llevó a cabo también con los poliésteres de 3º generación (HB32OH) y el de 4ª generación (HB64OH).

El grado de funcionalización fue evaluado por $^1\text{H-RMN}$. La figura 2 muestra los espectros de $^1\text{H-RMN}$ de los polímeros de mayor generación antes (HB64OH) y después (HB64S) de la esterificación de los grupos hidroxilo terminales. Estos espectros muestran la aparición de una nueva señal entre 7.60 y 8.00 ppm tras la esterificación que se atribuye a los anillos aromáticos que han sido covalentemente unidos a los grupos hidroxilo terminales del polímero comercial. Al mismo tiempo, las integraciones de las señales a 3.10-3.70 y 3.80-4.50 se ven modificadas tras la esterificación (su integración fue estimada tomando la señal de los grupos metilo a 1.00-1.50 como referencia). La señal a 3.10-3.70 ppm corresponde con los grupos metileno unidos a los enlaces éter ($-\text{CH}_2\text{-O}$) del núcleo central derivado del pentaeritritol y etilenglicol, y a los grupos metileno unidos a los grupos hidroxilo terminales. La integración de esta señal decrece tras la esterificación mientras que la integración de la señal a 3.80-4.50, asignada a los grupos metileno unidos a grupos éster ($-\text{CH}_2\text{-OOC}$), se ve incrementada tras el proceso de esterificación. Para el poliéster sulfonado con 64 grupos funcionales

(HB64S) los valores de integración revelan un grado de funcionalización del 80% aproximadamente (en promedio 52 de los 64 grupos hidroxilo iniciales). Para los poliésteres HB16OH y HB32OH los grados de funcionalización fueron estimados por ^1H -RMN en un 63% y un 87% respectivamente.

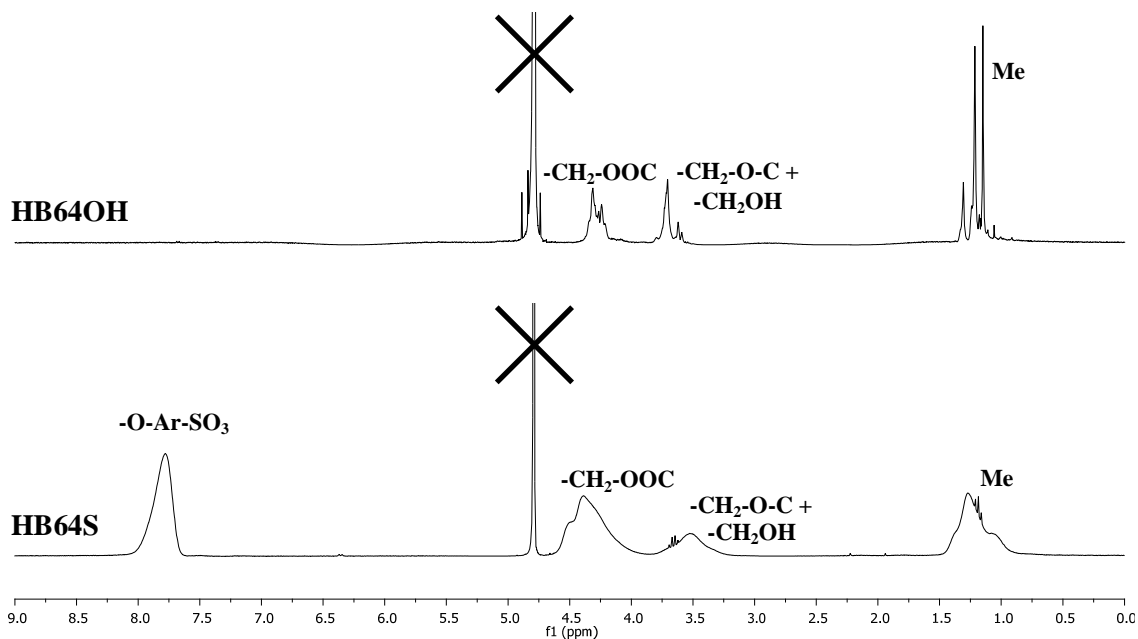


Fig. 2. Espectro de ^1H -RMN de HB64OH (arriba) y HB64S (abajo). El pico del disolvente está marcado con una cruz en el espectro.

Las propiedades térmicas de los poliésteres sulfonados se evaluaron por análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los estudios termogravimétricos (tabla 1) revelan que los polímeros son estables hasta temperaturas próximas a los 200°C. Para los poliésteres comerciales (HB16OH, HB32OH, HB64OH), se produce una descomposición total para temperaturas superiores a los 350°C, mientras que para los poliésteres sulfonados queda un residuo de aproximadamente un 40% cuando se calienta en atmósfera inerte. Este residuo se

descompone casi en su totalidad cuando se calienta por encima de 600°C en atmósfera oxidante de oxígeno.

Tabla 1. Temperaturas de descomposición de los poliésteres hiperramificados con grupos hidroxilo (HB16OH, HB32OH y HB64OH) y funcionalizados con grupos sulfonato (HB16S, HB32S y HB64S).

	T°C (2%)¹	T_{inic}²	T_{onset}³	T_{max}⁴
HB16OH	289	257	397	420
HB16S	78	223	310	339 690
HB32OH	35	190	297	322 390
HB32S	160	228	343	375 461 560
HB64OH	240	223	338	326 405
HB64S	170	230	340	383 466 571

¹ Temperatura a la que la muestra ha perdido un 2% de la masa total.

² Temperatura a la que comienza el proceso de descomposición.

³ Temperatura del *onset* del salto en la gráfica del porcentaje en peso.

⁴ Temperatura del máximo en la gráfica derivada del porcentaje en peso respecto a la temperatura.

En cuanto a sus propiedades térmicas, los poliésteres con grupos hidroxilo son polímeros amorfos con temperaturas de transición vítreas relativamente bajas (tabla 2) y que muestran un pico endotérmico durante el primer ciclo de calentamiento en torno a los 80°C. Este pico, que no se vuelve a observar en ciclos sucesivos, se atribuye a la fusión de regiones cristalinas del polímero inicial. Como puede verse en la tabla 2, la temperatura de transición vítrea para los poliésteres con grupos hidroxilo aumenta

conforme aumenta la generación del poliéster, lo que se atribuye al mayor número de grupos funcionales periféricos y, por consiguiente, al mayor número de interacciones intermoleculares. Por otra parte, en la tabla 2 también puede verse como la funcionalización con grupos sulfonato aumenta la temperatura de transición vítrea para todas las generaciones de polímeros, lo que podría estar relacionado con las interacciones iónicas debidas al grupo sulfonato (más fuertes que las interacciones por puentes de hidrógeno de los grupos hidroxilo).

Tabla 2. Temperaturas de transición vítrea (T_g) de los poliésteres hiperramificados con grupos hidroxilo terminales y modificados con grupos sulfonato (la temperatura de transición vítrea está medida en el punto medio del salto de capacidad calorífica en el segundo calentamiento a $10^\circ\text{C} / \text{min}$).

Polímero	T_g	Polímero	T_g
HB16OH	3°C	HB16S	21°C
HB32OH	6°C	HB32S	54°C
HB64OH	20°C	HB64S	70°C

5.2.2. PREPARACIÓN DE PELÍCULAS Y PROCESO DE FOTORRETICULACIÓN

Las formulaciones fotorreticulables fueron preparadas utilizando un 30% en peso del reticulante. Estas formulaciones fueron codificadas como HB16OH-30, HB32OH-30 y HB64OH-30 para los poliésteres de 2^a, 3^a y 4^a generación respectivamente con grupos hidroxilo terminales. De forma análoga, las formulaciones preparadas a partir de los poliésteres modificados con grupos sulfonato fueron

codificadas como HB16S-30, HB32S-30 y HB64S-30 (2^a, 3^a y 4^a generación respectivamente). Al preparar estas formulaciones, la adición de la disolución de reticulante (obtenida del matraz de reacción donde se prepara) a la disolución acuosa de polímero, lleva a la formación de una disolución turbia en el caso de los polímeros sulfonados. Esta turbidez se atribuye a la precipitación del complejo polielectrolítico (PEC) entre el polímero y el reticulante trifuncional con grupos diazonio. Por esta razón, el porcentaje de reticulante se redujo al 10% en peso para obtener formulaciones completamente homogéneas (codificadas como HB16S-10, HB32S-10 y HB64S-10 para la 2^a, 3^a y 4^a generación respectivamente) que se utilizaron para los diferentes estudios.

Estas formulaciones con el polímero y el reticulante se utilizaron para preparar películas fotorreticulables mediante *spin coating* (en las mismas condiciones experimentales descritas en el capítulo 3 para los sistemas modelo) que fueron irradiadas con luz UV. En capítulos anteriores se comprobó, mediante técnicas espectroscópicas, la reacción de las sales de diazonio con los grupos hidroxilo (PVA en el capítulo 3 y ácido hialurónico en el capítulo 4) y los grupos sulfonato (PSS en el capítulo 3). En este capítulo, se han llevado a cabo también estudios espectroscópicos utilizando como modelo películas fotorreticulables de HB16OH-30 que, como puede verse en la figura 3, muestran una morfología granulosa al ser observadas al microscopio óptico.

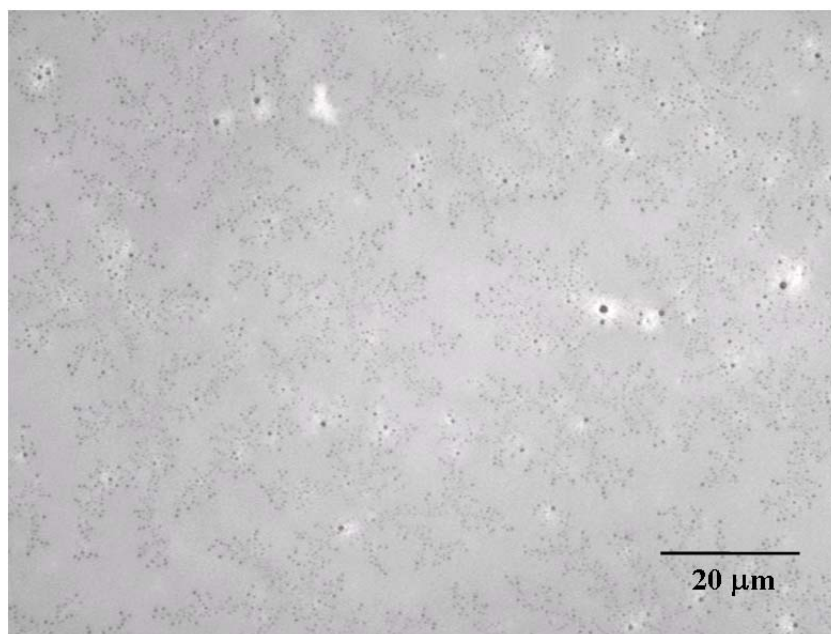


Fig. 3. Imagen de contraste de fase de una película de HB16OH-30 fotorreticulada sin estructurar.

La figura 4.a muestra los espectros de absorción UV-Vis de las películas de HB16OH-30 antes y después de ser irradiadas. En el caso del espectro UV-Vis se observa un crecimiento continuo de la absorbancia al decrecer la longitud de onda. Esto se atribuye a la dispersión de la luz provocada por los aglomerados observados en la figura 3. La señal debida a la transición $\pi\text{-}\pi^*$ aparece en 424 nm, lo que es consistente con estudios previos llevados a cabo en películas preparadas a partir de polímeros con grupos hidroxilo (PVA y hialuronato de sodio). Esta señal desaparece tras la irradiación, lo que indica la descomposición de las sales de diazonio. Además, el espectro de IR muestra la desaparición de una banda a 2239 (característica de los grupos diazonio que descomponen tras irradiar tal y como se ha visto en los capítulos anteriores) y muestra además cambios en la región de 1200-1350 cm^{-1} (figura 4.b). En esta región se pueden observar dos señales a 1284 y 1336 cm^{-1} , que se asignan a la vibración de los enlaces C-N del reticulante (anillos aromáticos unidos al átomo central de N y a los grupos

diazonio), y que desaparecen tras la irradiación. Al mismo tiempo aparece una banda ancha por debajo de 1300 cm^{-1} y otra banda a 1307 cm^{-1} . Estos cambios en el espectro de IR se relacionan con la descomposición fotoinducida de los grupos diazonio del reticulante y la reacción con los grupos hidroxilo terminales del polímero. Además, el cambio de solubilidad en disoluciones de NaOH (ac), observado para todas las formulaciones fotorreticulables tras la irradiación con luz UV, es una evidencia macroscópica del proceso de reticulación. Las películas iniciales son completamente solubles en este disolvente pero las películas irradiadas no son solubles y, por lo tanto, estas formulaciones pueden ser utilizadas para la preparación de patrones microestructurados tal y como se ha hecho con los sistemas poliméricos anteriormente estudiados.

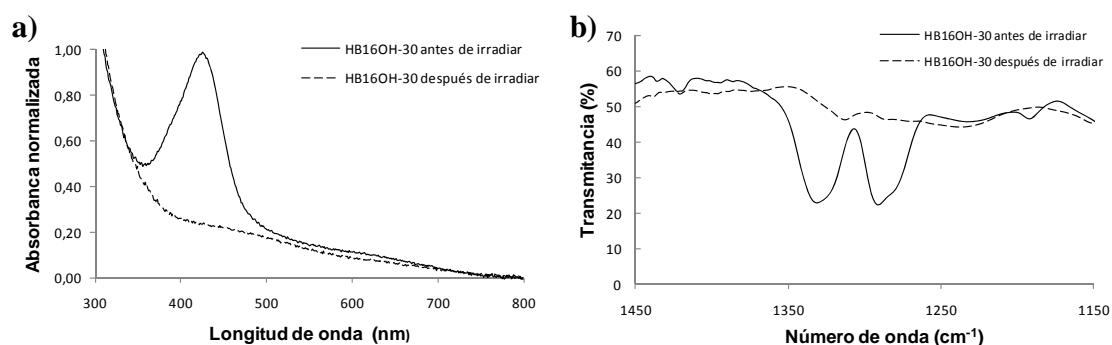


Fig. 4. Espectros de absorción UV-Vis (a) e IR (b) para películas de HB16OH-30 antes (línea continua) y después de irradiar (línea discontinua) con luz UV.

5.2.3. ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD

La biocompatibilidad de los poliésteres reticulados se estudió mediante ensayos de proliferación celular con MTT tal y como se hizo para las películas de hialuronato de sodio descritas en el capítulo 4. Así, se han cultivado las células (HeLa y fibroblatos

COS-7) durante 24, 48 o 72 h sobre películas fotorreticuladas sin estructurar de los polímeros sintéticos, tanto sobre películas de los poliésteres con grupos hidroxilo con un 30% en peso de reticulante (HB16OH-30, HB32OH-30 y HB64OH-30) como sobre películas de poliésteres con grupos sulfonato con un 10% de reticulante (HB16S-10, HB32S-10 y HB64S-10). Sin embargo, las películas de HB16S-10 y HB32S-10 no resisten los tres días de cultivo y se acaban soltando y disgregando en la disolución por lo que los estudios celulares sólo se completaron finalmente en películas de los poliésteres de mayor generación (HB64OH-30 y HB64S-10), que sí resisten adecuadamente para ambos casos.

La figura 5.a muestra los porcentajes de viabilidad celular de las células tumorales HeLa y los fibroblastos COS-7 tras 24 horas de cultivo sobre películas fotorreticuladas de los materiales poliméricos HB64OH-30 y HB64S-10 utilizando medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal (SBF), que son las condiciones de cultivo normales que fueron utilizadas en los ensayos descritos en el capítulo 4. En estos estudios se toma como referencia la viabilidad de estas células cultivadas en las mismas condiciones sobre sustratos de vidrio, a las que se les asigna un 100% de viabilidad celular. Los valores de viabilidad celular a 24, 48 y 72 horas se mantienen por encima de 100% (asignado al vidrio como referencia), lo que indica que los materiales estudiados no son tóxicos cuando son utilizados como soporte para el cultivo de células tumorales HeLa y los fibroblastos COS-7. De hecho, los porcentajes de viabilidad celular son superiores al 100% (valor asignado como referencia a la viabilidad celular en vidrio en estas condiciones tal y como se ha comentado), lo que podría estar relacionado con una mayor adhesión celular al sustrato.

Está descrito en la bibliografía que el SBF contiene proteínas y biomoléculas que pueden ser adsorbidas físicamente en la superficie del sustrato (por interacción

iónica y/o hidrófoba) favoreciendo la adhesión celular sobre dicho sustrato.^{6, 7} Para eliminar estas interacciones célula-sustrato a través de las proteínas físicamente adsorbidas, se realizaron estudios de MTT análogos a los anteriores utilizando medio de cultivo sin SBF. En este caso, el tiempo de cultivo se limitó a 24 horas ya que las células no pueden vivir durante más tiempo sin SBF (que también contiene nutrientes necesarios para el metabolismo celular). Tal y como se puede ver en la figura 5.b., los porcentajes de viabilidad celular cuando el cultivo se realiza sobre las películas poliméricas fotorreticuladas sin estructurar son mayores (en relación a los resultados obtenidos sobre vidrio en las mismas condiciones) que cuando el cultivo se realiza utilizando SBF, especialmente en el caso de los fibroblastos COS-7.

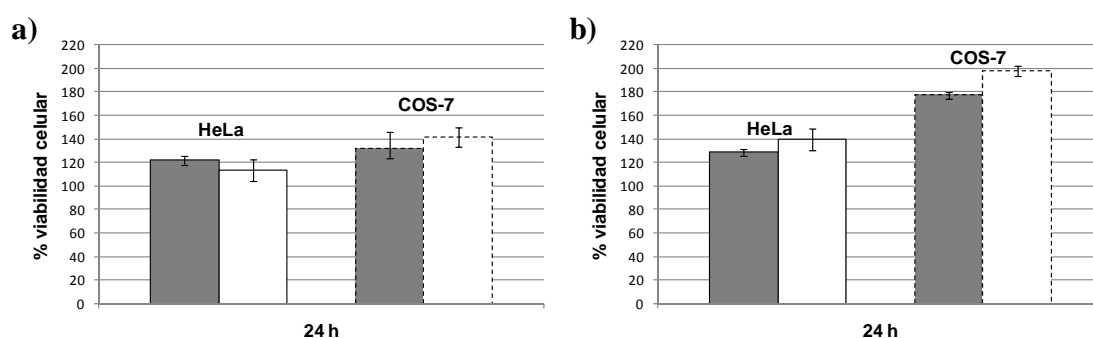


Fig. 5. Porcentaje de viabilidad celular de células tumorales HeLa (línea continua) y fibroblastos COS-7 (línea discontinua) cultivadas sobre películas poliméricas fotorreticuladas de HB64OH-30 (barras grises) y HB64S-10 (barras blancas) en presencia de SBF (a) y sin añadir SBF (b).

Para un mejor entendimiento de esta diferencia en los valores de viabilidad celular, se visualizó mediante microscopía de contraste de fase la morfología de las células cultivadas en los diferentes sustratos con y sin SBF en el medio de cultivo. Tras un periodo de incubación de 24 horas sobre un sustrato de vidrio, utilizando un medio enriquecido con SBF, las células tumorales HeLa muestran una morfología triangular

⁶ Hayman, E.G., Pierschbacher, M.D., Suzuki, S., Ruoslahti, E. *Exp. Cell Res.*, **1985**, *160*, 245-258.

⁷ Steele, J.G., Johnson, G., Griesser H.J., Underwood, P.A. *Biomaterials*, **1997**, *18*, 1541-1551.

(figura 6.a) mientras que los fibroblastos COS-7 muestran una morfología extendida (figura 6.e). Esta morfología es análoga a la que muestran en sustratos poliméricos fotorreticulados sin estructurar (no mostrados en la figura 6). Estas morfologías se asocian a una buena afinidad de las células por la superficie del sustrato.^{8,9} No obstante, tal y como se ha mencionado anteriormente, esta afinidad podría estar influenciada por los componentes del SBF adsorbidos en los diferentes sustratos. Cuando las células se cultivan en vidrio utilizando medio de cultivo sin SBF, éstas presentan una morfología significativamente menos extendida en la que las células se extienden sobre una superficie más pequeña del sustrato (figura 6.b para células tumorales HeLa y figuras 6.f para fibroblastos COS-7). Este hecho es especialmente importante en el caso de los fibroblastos COS-7, que muestran una morfología esférica que reduce en gran medida la superficie de contacto entre la célula y la superficie del sustrato. En el caso del cultivo llevado a cabo sin SBF sobre los sustratos poliméricos fotorreticulados sin estructurar, las células HeLa muestran una morfología más extendida (figura 6.c para HB64OH-30 y 6.d para HB64S-10) que sobre los sustratos de vidrio en las mismas condiciones de cultivo. Estas diferencias de morfología son todavía más importantes en el caso de los fibroblastos COS-7 que también muestran una morfología más extendida cuando son cultivados sin SBF sobre sustratos poliméricos (figura 6.g para HB64OH-30 y 6.h para HB64S-10), que cuando son cultivados sobre sustratos de vidrio, en los que muestran una morfología esférica (figura 6.f).

⁸ Owen, G.R., Meredith, D.O., Gwyn, I., Richards, R.G. *Eur. Cells Mater. J.*, **2005**, 9, 85-96.

⁹ Geiger, B., Spatz, J.P., Bershadsky, A.D. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, 10, 21-33.

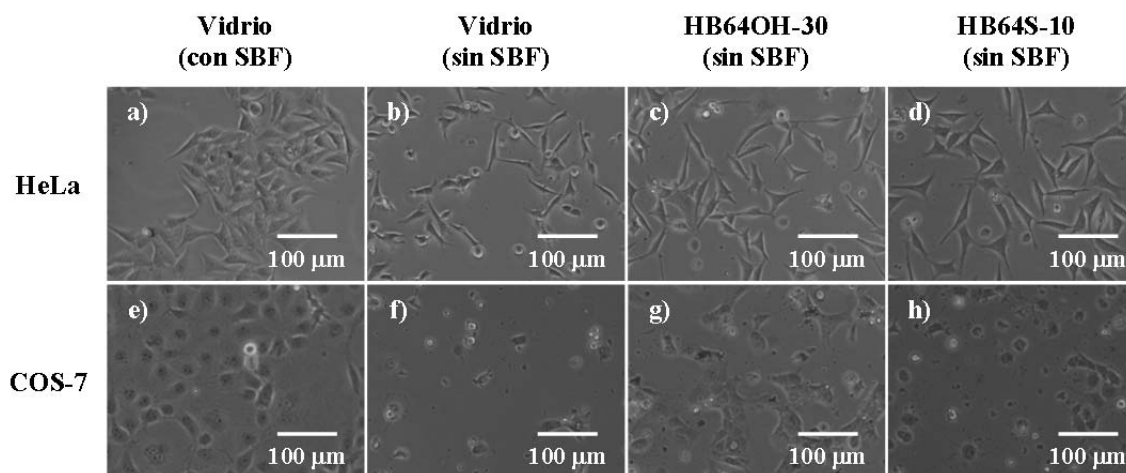


Fig. 6. Imágenes de contraste de fase de células tumorales HeLa y fibroblastos COS-7 cultivados en vidrio, HB64-OH y HB64S-10 con o sin SBF.

Esta diferencia con respecto al vidrio, que es algo mayor en el caso de los sustratos fotorreticulados sin estructurar de HB64OH-30 que sobre los sustratos poliméricos de HB64S-10, revela una mayor afinidad de las células por los materiales poliméricos con respecto al vidrio en ausencia de SBF (especialmente en el caso de los fibroblastos COS-7 tal y como se ha visto en la figura 6). Este hecho podría explicar la diferencia en los valores de viabilidad celular superiores a 100% observados en los ensayos de MTT en los que se utilizó el vidrio como referencia.

5.2.4. ESTRUCTURACIÓN CON LUZ

La mayor afinidad de las células por los materiales poliméricos fotorreticulados (con respecto al sustrato de vidrio) puede llevar a una proliferación celular selectiva cuando las células se cultivan sobre patrones poliméricos microestructurados. Para explorar esta posibilidad se generaron patrones poliméricos superficiales sobre sustratos de vidrio por escritura directa con láser (DLW). La figura 7 muestra las imágenes de contraste de fase de los patrones superficiales generados en películas de HB64OH-30 y

HB64S-10 por DLW utilizando el montaje descrito en el capítulo anterior. Tras una fotopolimerización selectiva y un lavado con una disolución acuosa de NaOH, para el HB64OH-30 se obtienen unas líneas de material microestructurado de un espesor muy fino (decenas de nanómetros) con agregados de material distribuidos por el área irradiada (figura 7.a), tal y como se observaba en películas sin estructurar (figura 3). Para el HB64S-10 (figura 7.b), este proceso lleva a la obtención de patrones con mayor espesor ya que el inicial de las películas obtenidas por *spin-coating* (en el orden de varios cientos de nm) es mayor que el obtenido en películas de HB64OH-30 (menor de 100 nm) debido a la mayor solubilidad de los poliésteres con grupos sulfato en disolución acuosa. En ambos materiales poliméricos (HB64OH-30 y HB64S-10), se observa una reducción del espesor de la película significativo tras el lavado con agua lo que podría estar relacionado con un bajo grado de reticulación.

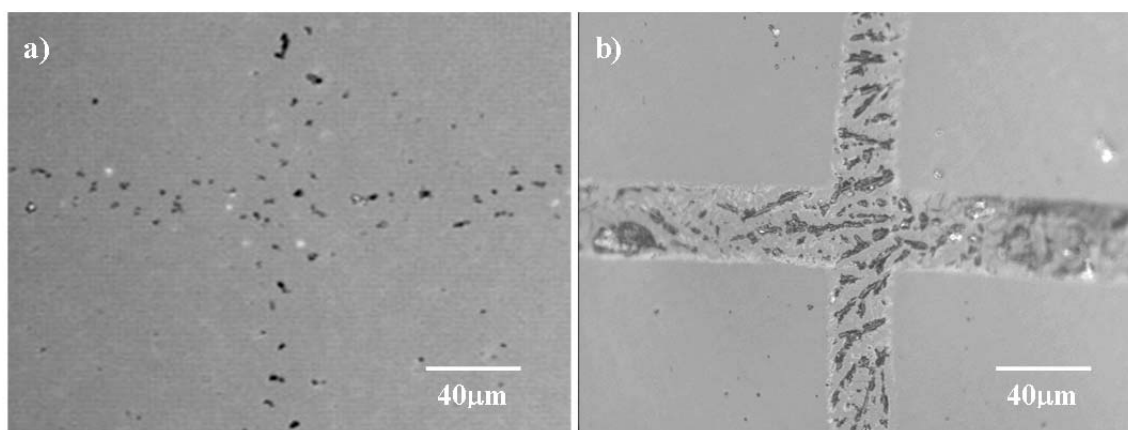


Fig. 7. Imágenes de contraste de fase de patrones superficiales generados por DLW en películas de HB64OH-30 (a) y HB64S-10 (b).

5.2.5. ESTUDIOS DE ADHESIÓN CELULAR

Se llevaron a cabo estudios de adhesión celular sobre estos patrones poliméricos superficiales cultivando células tumorales HeLa y fibroblastos COS-7 utilizando medio con SBF para garantizar un correcto crecimiento de las células durante periodos

prolongados. Tras el cultivo celular, se llevó a cabo el **marcaje fluorescente de las fibras de actina** para visualizar mediante microscopía confocal de fluorescencia la estructura celular. La figura 8 muestra una composición formada a partir de diferentes imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia confocal para crear imágenes mapa de las células cultivadas sobre estructuras poliméricas de HB64S-10. Tal y como puede verse en la figura 8.a, las células HeLa están preferentemente colocadas encima de las líneas poliméricas con estructura de rejilla cuadrangular. Los cuadrados que encierran estas líneas poliméricas corresponden a regiones de vidrio sin material polimérico y aparecen negras casi en su totalidad en las imágenes de fluorescencia, lo que se debe a la ausencia de células en estas regiones. Para los fibroblastos COS-7 (figura 8.b), la rejilla de cuadrados verde correspondiente a las células adheridas sobre la superficie del patrón polimérico está menos definida y se encuentran más células en el espacio entre estas líneas (cuadrados correspondientes a sustrato de vidrio sin material polimérico). Estas observaciones parecen indicar que, en el caso de las células HeLa, podrían haber migrado desde el vidrio hasta el patrón polimérico, lo que explicaría el bajo número de células en los cuadrados de vidrio sin material polimérico. Esta diferencia entre las células HeLa y los fibroblastos COS-7 podría estar relacionada con la mayor movilidad de las células HeLa que permite una migración más rápida en comparación con los fibroblastos COS-7.¹⁰

¹⁰ Small, J.V., Anderson, K., Rottner, K. *Biosci. Rep.*, **1996**, *16*, 351-368.

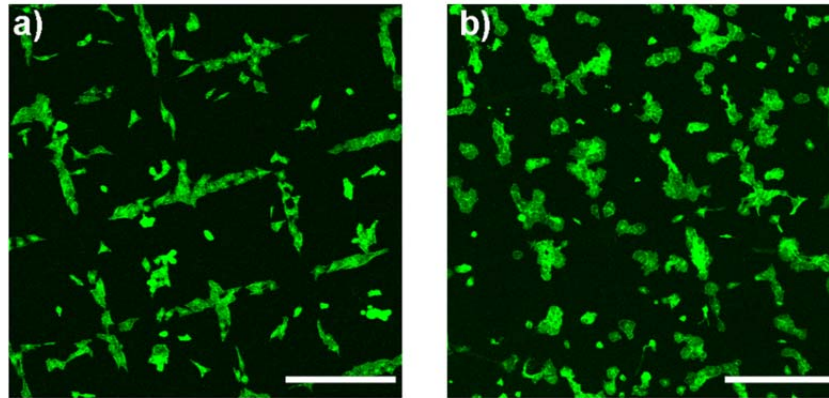


Fig. 8. Imágenes mapa de microscopía confocal de un marcaje fluorescente de las fibras de actina con faloidina en células tumorales HeLa (a) y fibroblastos COS-7 (b) en patrones superficiales de HB64S-10.

Se llevaron a cabo también **marcajes fluorescentes de vinculina** para localizar los puntos focales de adhesión de las células a los patrones poliméricos superficiales.¹¹ Tal y como puede verse en la figura 9, ambas líneas celulares (células tumorales HeLa y fibroblastos COS-7) se encuentran preferentemente organizadas en líneas que corresponden con los patrones poliméricos superficiales (tal y como se comprueba por las imágenes de contraste de fase). Las células adoptan una morfología extendida en todos los materiales al ser cultivados con SBF (tal y como se menciona en el apartado 5.2.3). La expresión de vinculina en ciertos puntos del borde del citoplasma (ampliación de la figura 9.a) indica que los puntos focales de adhesión se localizan en el material polimérico (y no sobre el vidrio). Todos estos resultados corroboran la buena adhesión en los materiales poliméricos sin estructurar y la preferencia por estos materiales con respecto al sustrato de vidrio, incluso cuando el cultivo se realiza con SBF.

¹¹ Ziegler, W.H., Liddington, R.C., Critchley, D.R. *Trends Cell Biol.*, **2006**, *16*, 453-460.

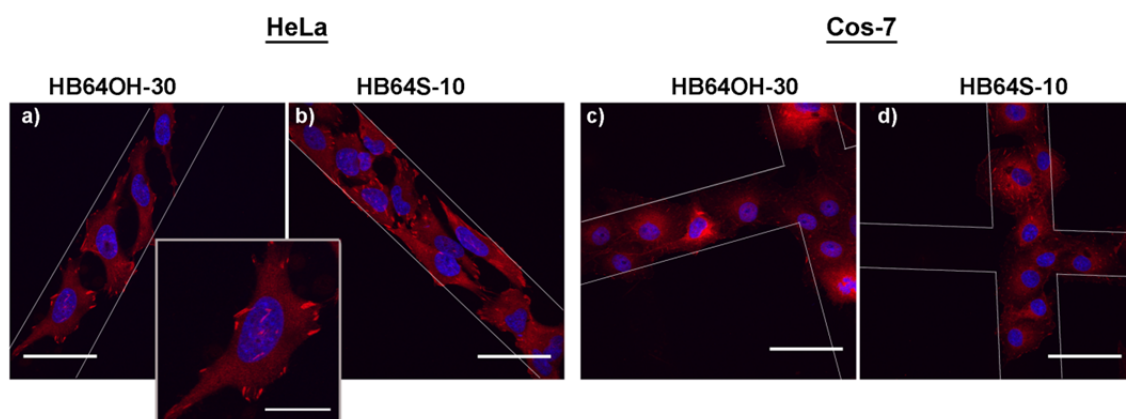


Fig. 9. Imágenes de microscopía confocal de un marcaje fluorescente de las fibras de vinculina con Texas Red y los núcleos de DAPI en células tumorales HeLa (a, b) y fibroblastos COS-7 (c, d) en patrones superficiales de HB64OH-30 (a, c) y HB64S-10 (b, d).

5.3. RESUMEN

Se ha aplicado la descomposición fotoinducida de los grupos diazonio a la fotorreticulación de poliésteres alifáticos hiperramificados con grupos hidroxilo y sulfonato utilizando un reticulante trifuncional de bajo peso molecular.

La reacción de fotorreticulación se ha confirmado por técnicas de espectroscopia UV-Vis e IR, así como se ha comprobado también macroscópicamente por un cambio de solubilidad de las películas en disoluciones acuosas de NaOH.

Se ha estudiado la biocompatibilidad de los materiales fotorreticulados mediante ensayos de MTT con películas sin estructurar en el caso de los poliésteres con grupos hidroxilo con un 30% en peso de reticulante y de los poliésteres sulfonados con un 10% en peso de reticulante. Estos estudios revelaron que la viabilidad celular es mayor sobre los materiales poliméricos que sobre el vidrio, especialmente en ensayos realizados cultivando las células con medio de cultivo sin SBF, lo que puede ser debido a una mayor adhesión de las células al material polimérico que al vidrio. Esta mayor adhesión

al material polimérico (con respecto al vidrio) se confirmó mediante cultivos celulares llevados a cabo sobre patrones poliméricos superficiales generados por DLW, que inducen una adhesión selectiva de las células sobre el patrón polimérico superficial, especialmente en el caso de las células HeLa que tienen una mayor movilidad.

5.4. EXPERIMENTAL

5.4.1. MATERIALES

Los polímeros seleccionados para este estudio son los poliésteres alifáticos hiperramificados derivados del ácido 2,2-dihidroximetilpropiónico con 16 (HB16OH), 32 (HB32OH) y 64 (HB64OH) grupos hidroxilo. Estos poliésteres (de 2^a, 3^a y 4^a generación) fueron suministrados por Aldrich y se utilizaron sin necesidad de tratamiento previo. Sus pesos moleculares promedio están en torno a 1750, 3600 y 7300 respectivamente (según el fabricante).

Para la funcionalización de los poliésteres con grupos sulfonato se utilizó la sal de potasio del ácido 4-hidroxicarbonilbencensulfónico. (Aldrich) y cloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC, Aldrich) como agente de condensación. Como catalizador se utilizó p-toluensulfonato de 4-dimetilaminopiridinio (DPTS) preparada en el laboratorio por precipitación de ambos componentes (suministrados por Aldrich) en THF.

Como reticulante se ha utilizado la sal de diazonio trifuncional cloruro de N,N,N-tris((4-diazofenil)amina) que fue preparada tal y como se describe en el apartado 3.4.2 del capítulo 3.

Los estudios celulares se llevaron a cabo con células tumorales HeLa y con fibroblastos COS-7 como ejemplo de línea celular sana (*African Green Monkey SV40-transfected kidney fibroblasts*) tal y como se describe en el apartado 4.4.1 del capítulo 4. En este apartado se describen también los reactivos utilizados para realizar los cultivos celulares sobre los diferentes sustratos.

Para los estudios de biocompatibilidad se utilizó el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) tal y como se describe en el apartado 4.4.1 del capítulo 4.

Para el marcaje fluorescente de las fibras de actina y vinculina del citoesqueleto celular se utilizaron los anticuerpos y marcadores fluorescentes descritos en el apartado 4.4.1 del capítulo 4.

5.4.2. SÍNTESIS DE LOS POLIÉSTERES HIPERRAMIFICADOS CON GRUPOS SULFONATO

Los poliésteres sulfonados de diferente generación HB16S, HB32S y HB64S (siendo 16, 32 y 64 el número total de grupos funcionales terminales) se sintetizaron mediante una esterificación de Steglich de los grupos hidroxilo terminales de los poliésteres HB16OH, HB32OH y HB64OH con la sal de potasio del ácido 4-hidroxicarbonilbencensulfónico. Para ello se disolvieron 2 g del poliéster correspondiente en 150 mL de DMF. A continuación, se añadieron las cantidades correspondientes de la sal de potasio del ácido 4-hidroxicarbonilbencensulfónico (1.25 mol por cada mol de OH del polímero) y de DPTS (0.5 mol por cada mol de OH del polímero). La mezcla se enfrió en baño de hielo y se añadió gota a gota la cantidad correspondiente de EDC (1.25 mol por cada mol de grupos hidroxilo del polímero)

previamente disuelta en 10 mL de DMF. La mezcla se dejó agitando durante 48 h. Tras este periodo, la mezcla de reacción se dializó frente a una disolución acuosa de NaCl saturada durante 48 h y luego se dializó otras 48 h frente a agua destilada. Por último se evaporó la disolución y se secó a vacío y a 60°C durante 24 h.

HB16S Rdto: 74%

HB32S Rdto: 80%

HB64S Rdto: 71%

HB16S ¹H-RMN (400 MHz, D₂O, δ): 7.60-8.00 (m, 40H, CH ar), 3.80-4.50 (m, 42H, CH₂), 3.10-3.70 (m, 28H, CH₂), 0.80-1.40 (m, 36H, CH₃). IR (CaF₂, cm⁻¹): 1728 (C=O), 1610 (ArC=C), 1280 (SO₃), 1205, 1109 (C-O). Análisis elemental: C 45.63 %, H 5.56 %, S 7.25 % (calculado para C₁₄₅H₁₆₈S₁₀O₈₅Na₁₀: C 43.74 %, H 4.22 %, S 8.04 %).

HB32S ¹H-RMN (400 MHz, D₂O, δ): 7.60-8.00 (m, 113H, CH ar), 3.80-4.50 (m, 110H, CH₂), 3.10-3.70 (m, 35H, CH₂), 0.80-1.40 (m, 84H, CH₃). IR (CaF₂, cm⁻¹): 1720 (C=O), 1633 (ArC=C), 1265 (SO₃), 1186, 1091 (C-O). Análisis elemental: C 42.18 %, H 4.02 %, S 8.87 % (calculado para C₃₅₁H₃₄₀S₂₈O₂₀₅Na₂₈: C 44.94 %, H 3.63 %, S 9.56 %).

HB64S ¹H-RMN (400 MHz, D₂O, δ): 7.55-7.95 (m, 208H, CH ar), 3.80-4.50 (m, 206H, CH₂), 3.10-3.70 (m, 70H, CH₂), 0.80-1.40 (m, 180H, CH₃). IR (CaF₂, cm⁻¹): 1726 (C=O), 1633 (ArC=C), 1274 (SO₃), 1191, 1095 (C-O). Análisis elemental: C 41.78 %, H 3.32 %, S 10.94 % (calculado para C₅₁₉H₄₁₂S₅₂O₃₀₁Na₅₂: C 43.50 %, H 2.88 %, S 11.62 %).

5.4.3. PREPARACIÓN DE PELÍCULAS FOTORRETICULABLES

Las películas fotorreticulables se prepararon a partir de formulaciones del correspondiente polímero y una cantidad controlada del reticulante (expresada en porcentaje en peso). La sal de diazonio utilizada como reticulante fue preparada *in situ* en disolución acuosa tal y como se describe en el apartado 3.4.2 del capítulo 3 y a continuación se adicionó sobre una disolución del poliéster en agua Milli-Q. Para los poliésteres con grupos hidroxilo (HB16OH, HB32OH y HB64OH) se ajustó la cantidad de reticulante a un 30% en peso, dando lugar a las formulaciones codificadas como HB16OH-30, HB32OH-30 y HB64OH-30 respectivamente. Para los poliésteres sulfonados se utilizaron dos porcentajes de reticulante diferentes. Las formulaciones con un 30% en peso de reticulante fueron codificadas como HB16S-30, HB32S-30 y HB64S-30 respectivamente. Las formulaciones con un 10% en peso de reticulante fueron codificadas como HB16S-10, HB32S-10 y HB64S-10 respectivamente.

Estas disoluciones se utilizaron para preparar películas por *spin coating* (un ciclo de 1000 rpm durante 5 s y otro ciclo de 3000 rpm durante 100 s) de estas disoluciones en sustratos limpios de vidrio (para medidas de absorción UV-Vis y estudios celulares) o fluorita (estudios IR) tal y como se describe en el apartado 4.4.2 del capítulo 4.

5.4.4. PROCESO DE FOTORRETICULACIÓN

Para los estudios de espectroscopia UV-Vis, IR y para los ensayos de viabilidad celular se utilizaron películas sin estructurar fotorreticuladas con un haz de luz UV tal y como se describe en el apartado 4.4.3 del capítulo 4. Para los estudios de adhesión se utilizaron patrones poliméricos superficiales generados por DLW con el montaje también descrito en el apartado 4.4.3.

5.4.5. ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD

Los estudios de biocompatibilidad se llevaron a cabo mediante ensayos de viabilidad celular con MTT tal y como se describe en el apartado 4.4.4 del capítulo 4.

5.4.6. ESTUDIOS DE ADHESIÓN CELULAR

Los estudios de adhesión celular se llevaron a cabo cultivando las células (HeLa o fibroblastos COS-7) sobre patrones poliméricos de geometría controlada generadas por DLW, tal y como se describe en el primer párrafo del apartado 4.4.5 del capítulo 4. En este caso el cultivo se llevó a cabo con una densidad de 5000 células en 1 mL de medio de cultivo.

El marcaje fluorescente de las fibras de actina y de vinculina en estas células se llevó a cabo por el procedimiento descrito en el apartado 4.4.5 del capítulo 4.

5.4.7. TÉCNICAS

La caracterización química de los macromonómeros se llevó a cabo por ^1H -RMN utilizando los mismos equipos que los descritos en el capítulo 3 y utilizando agua deuterada (D_2O) como disolvente para los distintos poliésteres (tanto con grupos hidroxilo como modificados con grupos sulfonato). La estabilidad térmica de los compuestos fue caracterizada en una balanza termogravimétrica TA Q-5000 a $10^\circ\text{C}/\text{min}$ bajo atmósfera de N_2 hasta 600°C . Las transiciones térmicas fueron medidas en un calorímetro Q-2000 de TA Instruments trabajando en atmósfera de N_2 a una velocidad de calentamiento / enfriamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. Los valores de la temperatura de

transición vítrea (T_g) se midieron en el punto medio del incremento de la capacidad calorífica durante el primer ciclo de calentamiento.

La caracterización espectroscópica del proceso de reticulación y de las estructuras poliméricas obtenidas se llevó a cabo con los mismos equipos que los descritos en el capítulo 3.

Los estudios de biocompatibilidad celular se llevaron a cabo midiendo la absorbancia a 570 nm del formazán generado en el equipo descrito en el capítulo 4.

Para los estudios de adhesión celular, las secciones teñidas con marcadores fluorescentes se visualizaron con el microscopio de fluorescencia confocal también descrito en el capítulo 4.

6. FOTORRETICULACIÓN DE POLIÉSTERES ALIFÁTICOS POR QUÍMICA DE TIOL-INOS

*(parte de los resultados de este capítulo han sido publicado en la revista
Macromolecular Bioscience, 2011, Vol. 11, p. 1505-1514)*

6.1. INTRODUCCIÓN

En la reacción fotoinducida conocida como reacción de tiol-inos, explicada en los Antecedentes de esta memoria, dos grupos tiol se adicionan regioselectivamente a un triple enlace (esquema 1) por un mecanismo análogo a la reacción fotoiniciada de tioles y alquenos (tiol-enos) que ha sido más empleada en la preparación de materiales poliméricos. La reacción de tiol-inos tiene una serie de características de química *click* como rapidez y alto rendimiento, que han sido aprovechadas en síntesis de polímeros,^{1, 2, 3} funcionalización de superficies^{4, 5, 6, 7} y acoplamiento entre macromoléculas.^{8, 9} La reacción de tiol-inos también permite llevar a cabo procesos de fotorreticulación que llevan a la obtención de redes poliméricas tal y como demostraron Bowman y colaboradores en diversos estudios con monómeros multifuncionales no poliméricos.^{10, 11, 12} Como se ha comentado en el apartado 1.3.2 de los Antecedentes de esta tesis, estas reacciones de fotorreticulación que transcurren por reacción entre dos grupos funcionales evitan la formación de cadenas carbonadas no biodegradables, como ocurre en la polimerización radicalaria de acrilatos, por lo que dan lugar a materiales que pueden ser totalmente degradados.^{13, 14, 15} Además, estas redes poliméricas tienen una

¹ Chan, J.W., Hoyle, C.E., Lowe, A.B. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 5751-5753.

² Liu, W., Dong, C.M. *Macromolecules*, **2010**, *43*, 8447-8455.

³ Amir, R.J., Albertazzi, L., Willis, J., Khan, A., Kang, T., Hawker, C.J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 1-6.

⁴ Massi, A., Nanni, D. *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 3791-3807.

⁵ Wang, C., Ren, P.F., Huang, X.J., Wu, J., Xu, Z.K. *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 3930-3932.

⁶ Hensarling, R.M., Doughty, V.A., Chan, J.W., Patton, D.L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 14673-14675.

⁷ Mehlich, J., Ravoo, B.J. *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 4108-4115.

⁸ Semsarilar, M., Ladmiraal, V., Perrier, S. *Macromolecules*, **2010**, *43*, 1438-1443.

⁹ Slavin, S., Burns, J., Haddleton, D.M., Becer, C.R. *Eur. Polym. J.*, **2011**, *47*, 435-446.

¹⁰ Fairbanks, B.D., Scott, T.F., Kloxin, C.J., Anseth, K.S., Bowman, C.N. *Macromolecules*, **2009**, *42*, 211-217.

¹¹ Fairbanks, B.D., Sims, E.A., Anseth, K.S., Bowman, C.N. *Macromolecules*, **2010**, *43*, 4113-4119.

¹² Chan, J. W., Shin, J., Hoyle C.E., Bowman, C.N., Lowe, A. B. *Macromolecules*, **2010**, *43*, 4937-4942.

¹³ Rydholm, A.E., Bowman, C.N., Anseth, K.S. *Biomaterials*, **2005**, *26*, 4495-4506.

¹⁴ Reddy, S.K., Anseth, K.S., Bowman, C.N. *Polymer*, **2005**, *46*, 4212-4222.

¹⁵ Rydholm, A.E., Reddy, S.K., Anseth, K.S., Bowman, C.N. *Polymer*, **2007**, *48*, 4589-4600.

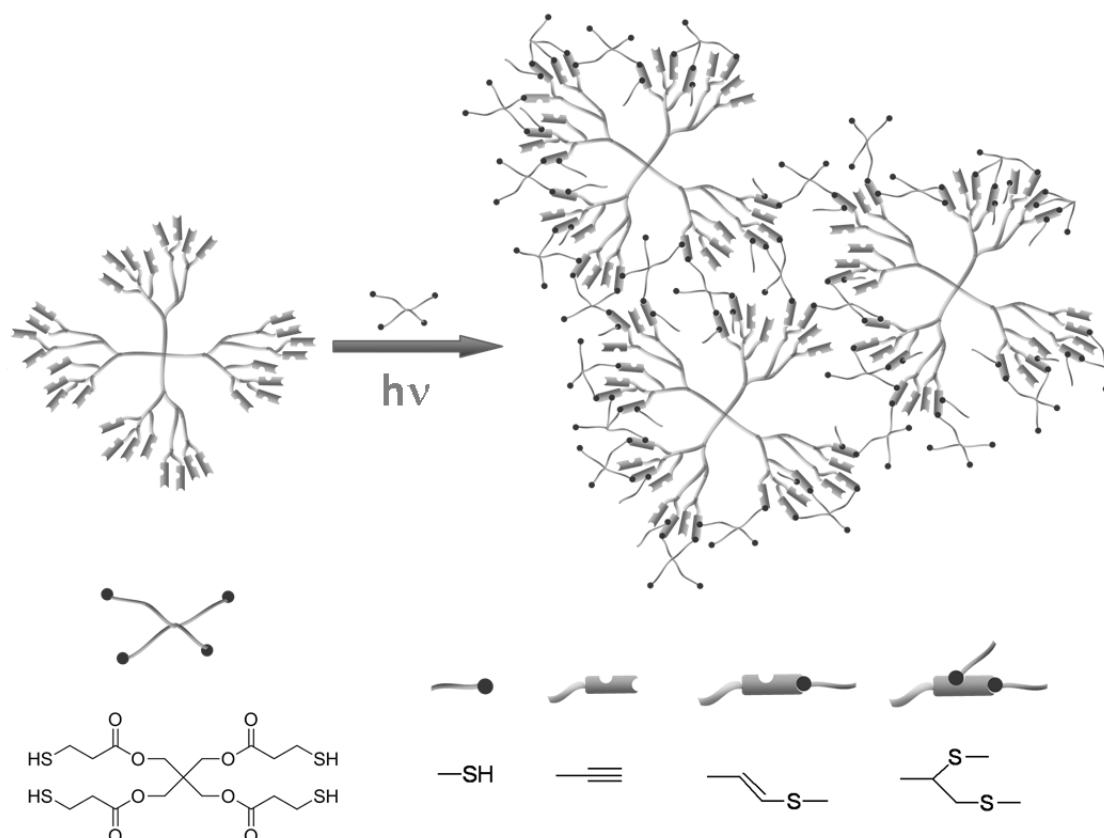
A pesar de todo ésto, la reacción de tiol-inos nunca se había aplicado a la preparación de biomateriales hasta el comienzo de esta tesis doctoral. En este capítulo se describe la preparación de biomateriales mediante fotorreticulación de macromonómeros funcionalizados con grupos alquino utilizando un tiol multifuncional como reticulante (esquema 2). Estos macromonómeros, que serán obtenidos por funcionalización de un poliéster hiperramificado (tipo Boltorn[®]),²² favorecen la formación de redes altamente entrecruzadas gracias a su estructura ramificada. Los macromonómeros, químicamente análogos pero con distinto grado de funcionalización, serán entrecruzados utilizando distintas proporciones de agente reticulante para obtener de esta forma distintos materiales en los que varía el grado de reticulación.

¹⁹ Sun, X.L., Stabler, C.L., Cazalis, C.S., Chaikof, E.L. *Bioconj. Chem.*, **2006**, *17*, 52-57.

²⁰ Bertin, A., Schlaad, H. *Chem. Mater.*, **2009**, *21*, 5698-5700.

²¹ Wendeln, C., Rinnen, S., Schulz, C., Arlinghaus, H.F., Ravoo, B.J. *Langmuir*, **2010**, *26*, 15966-15971.

²² Zagar, E., Zigon, M. *Prog. Polym. Sci.*, **2011**, *36*, 53-88.



Esquema 2. Fotorreticulación de los macromonómeros basados en poliésteres con grupos alquino terminal, utilizando como reticulante un tetratiol de bajo peso molecular.

Tras caracterizar el proceso de fotorreticulación y las propiedades térmicas de los distintos materiales (dos macromonómeros distintos fotorreticulados con distintos grados de reticulación), se estudiará la biocompatibilidad de todos ellos como sustrato para el crecimiento celular con células tumorales HeLa y fibroblastos COS-7, tal y como se hizo en los capítulos 4 y 5 con los materiales entrecruzados con sales de diazonio. Mediante la técnica de escritura directa con láser se generarán estructuras de geometría controlada para llevar a cabo estudios de adhesión celular. En estos estudios se modificarán parámetros topográficos de la estructura como altura y anchura de línea para ver la influencia de estos parámetros en el comportamiento celular.

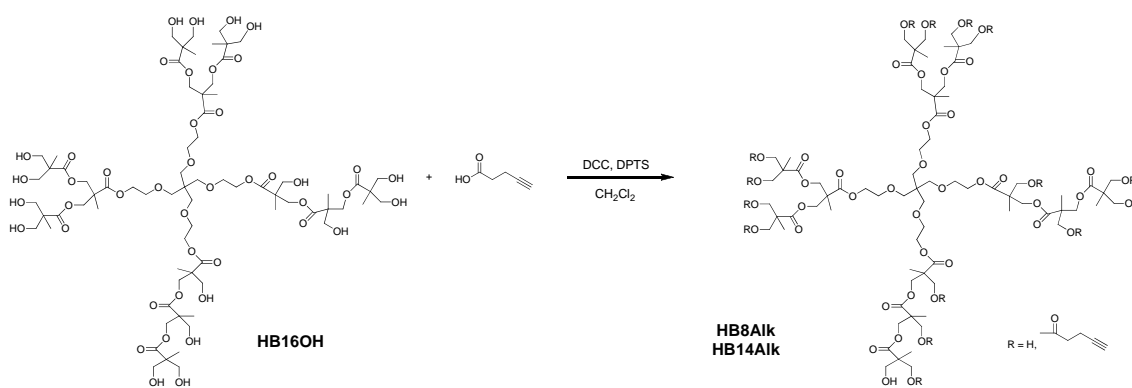
6.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.2.1. SÍNTESIS DE LOS MACROMONÓMEROS

Tal y como se ha comentado en el capítulo 5, son varias las aplicaciones descritas en Medicina para poliésteres alifáticos, como los polihidroxialcanoatos lineales, debido a su biocompatibilidad. En fechas recientes se ha comenzado a estudiar otras estructuras como es el caso de los poliésteres alifáticos hiperramificados que aportan un alto grado de funcionalidad terminal debido a su estructura ramificada.²² Entre ellos, los poliésteres del ácido 2,2-(dihidroximetil)propiónico (Bis-MPA), conocido comercialmente como Boltorn[®], han sido previamente estudiados en la preparación de biomateriales.^{22, 23, 24} El poliéster seleccionado fue el HB16OH, ya utilizado en el capítulo 5 y que contiene en promedio 16 grupos OH terminales. Este polímero fue funcionalizado con ácido 4-pentinoico para introducir grupos alquino en su periferia (esquema 3), obteniéndose dos macromonómeros con diferente grado de funcionalización: uno con un grado medio de funcionalización (8 grupos alquino de los 16 totales promedio) y otro con un grado alto de funcionalización (14 grupos alquino de los 16 totales promedio). Estos grupos alquino permiten la fotorreticulación del polímero mediante la reacción de tiol-inos con un reticulante con grupos tiol multifuncional en presencia de un pequeño porcentaje de fotoiniciador.

²³ Borgaonkar, P., Sharma, S., Chen, M., Bhowmick S., Schmidt D.F. *Macromol. Biosci.* **2007**, 7, 201-207.

²⁴ Reul, R., Nguyen, J., Kissel, T. *Biomaterials*, **2009**, 30, 5815-5824.



Esquema 3. Funcionalización de los grupos hidroxilo del poliéster hiperramificado HB16OH con ácido 4-pentinoico. El macromonomero HB8Alk posee, en promedio, 8 grupos alquino mientras que el HB14Alk posee 14 grupos alquino en promedio

La síntesis de los macromonomeros se llevó a cabo mediante una esterificación de Steglich de los grupos hidroxilo terminales. Dichos grupos hidroxilo se funcionalizaron con ácido 4-pentinoico utilizando N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC) como agente de condensación y la sal p-toluensulfonato de 4-dimetilaminopiridinio (DPTS) como catalizador. Una vez purificado y secado el polímero, se estudió el porcentaje de esterificación mediante $^1\text{H-RMN}$. La figura 1 muestra los espectros del polímero precursor (HB16OH en la figura 1.a) y de los dos macromonomeros obtenidos con distinto grado de funcionalización (HB8Alk en la figura 1.b y HB14Alk en la figura 1.c). En estos espectros puede evaluarse el grado de funcionalización del poliéster por las señales asociadas al grupo 4-pentinoílo unido al polímero por esterificación. Estas señales aparecen aproximadamente a 2 ppm ($\text{C}_{\text{sp}}\text{-H}$, señal f), 2.40-2.50 ppm ($\text{C}_{\text{sp}}\text{-CH}_2$, señal g) y 2.50-2.60 ppm ($\text{C}_{\text{sp}}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$, señal h). Su integración permite evaluar el grado de funcionalización del polímero tomando como referencia la integración de las señales que aparecen a 1-1.3 ppm de los grupos metilo del polímero, a las que se asigna una integración de 36 H considerando el promedio de 16 grupos funcionales. En este

caso dichas señales integran por 8, 17, 16 respectivamente en el caso del HB8Alk, lo que indica una funcionalización aproximada de 8 grupos alquino terminales por macromolécula. Para el HB14Alk las integraciones son de 14, 29 y 29 H respectivamente, lo que indica que se han introducido aproximadamente 14 grupos alquino en el polímero. Además las señales anchas (debido a la naturaleza hiperramificada del polímero) alrededor de 3.4 y 4.1 ppm se ven modificados tras el proceso de esterificación. La primera señal corresponde a los grupos metileno (-CH₂-) del núcleo central derivado del pentaeritritol y a los grupos metileno unidos a los grupos hidroxilo terminales. Esta señal, que integra por 48 H en el HB16OH, pasa a integrar por 34 H en el HB8Alk y 18 H en el HB14Alk, mientras que la señal en torno a 4.1 ppm se debe a los grupos -CH₂-OOC- y pasa de integrar por 24 H en el HB16OH a integrar por 42 H en el HB8Alk y por 51 H en el HB14Alk. Estos cambios relativos en las integraciones de las señales concuerdan con una funcionalización promedio de 8 y 14 grupos respectivamente, y están en consonancia con la estimación de las integraciones de las señales de los grupos 4-pentinoílo. Se puede observar también un cambio en los grupos metilo que, en el HB16OH y el HB8Alk dan lugar a señales muy próximas debidas a los metilo próximos a grupos éster, próximos a grupos hidroxilo de la periferia que no han sido funcionalizados o a uno de cada tipo. En el HB14Alk, que tiene un alto grado de funcionalización, la mayoría de grupos metilo están próximos a enlaces éster, ya sean metilos internos del poliéster o metilos de la periferia próximos a grupos hidroxilo esterificados. Esto hace que estos grupos metilo en el espectro de ¹H-RMN se agrupen principalmente en una única señal.

Se han llevado a cabo asimismo estudios de la composición química por análisis elemental, lo que nos permite corroborar la estructura estimada por ^1H -RMN. Se ha visto que los datos experimentales obtenidos para los polímeros funcionalizados (tabla 1) concuerdan con los datos calculados para la fórmula molecular estimada por ^1H -RMN.

Tabla 1. Composición química (expresada en porcentaje de cada tipo de átomo) de los poliésteres HB16OH, HB8Alk y HB14Alk. Los resultados de las columnas con el encabezado *Calc* son calculados a partir de la fórmula molecular estimada por RMN. Los resultados de la columna *Exp* son los obtenidos experimentalmente.

	HB16OH Calc.	HB16OH Exp.	HB8Alk Calc.	HB8Alk Exp.	HB14Alk Calc.	HB14Alk Exp.
C	51.49	51.15	57.79	58.28	60.37	60.93
H	7.32	7.05	6.70	6.74	6.48	6.48
O	41.19	41.81	35.51	34.98	32.36	32.35

La estabilidad térmica del polímero comercial y de los dos macromonómeros fue estudiada por termogravimetría calentando a $10^\circ\text{C}/\text{min}$ en atmósfera inerte (nitrógeno) desde temperatura ambiente hasta 600°C . Los estudios de termogravimetría (TGA) recogidos en la tabla 2 muestran que al funcionalizar el polímero de partida HB16OH con grupos alquino el proceso de descomposición comienza a temperaturas más bajas. No obstante, los compuestos presentan estabilidad térmica a la temperatura a la que se llevan a cabo los experimentos de fotorreticulación y estructuración con luz.

Tabla 2. Temperaturas de descomposición de los poliésteres hiperramificados con grupos hidroxilo (HB16OH) y funcionalizados con grupos alquino (HB8Alk y HB14Alk).

	T°C (2%) ¹	T _{inic} ²	T _{onset} ³	T _{max} ⁴
HB16OH	289	260	386	420
HB8Alk	174	160	177	197
				379
				420
HB14Alk	270	274	328	396

¹ Temperatura a la que la muestra ha perdido un 2% de la masa total.

² Temperatura a la que comienza el proceso de descomposición.

³ Temperatura del *onset* del salto en la gráfica del porcentaje en peso.

⁴ Temperatura del máximo en la gráfica derivada del porcentaje en peso respecto a la temperatura.

Se estudiaron también las transiciones térmicas de los macromonómeros hiperramificados mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Tanto HB8Alk como HB14Alk son obtenidos como polímeros semicristalinos que muestran un pico endotérmico de fusión en el primer proceso de calentamiento alrededor de 65°C (HB8Alk) y 50°C (HB14alk) respectivamente. Sin embargo, una vez fundidos los polímeros no cristalizan durante el enfriamiento y en los sucesivos ciclos sólo se observa la transición vítrea (T_g) que aparece a -13°C (HB8Alk) y a -23°C (HB14Alk) tal y como puede verse en la figura 2. Estos valores suponen un descenso respecto al polímero de partida (HB16OH) que también es un polímero semicristalino que muestra una T_g a 2°C y dos picos de fusión que aparecen a 52°C y 90°C únicamente en el primer

proceso de calentamiento. Este valor de T_g más elevado podría deberse a las interacciones por puentes de H entre grupos hidroxilo que reducen la movilidad molecular.²² La menor presencia de grupos OH en los polímeros sustituidos explicaría la reducción de T_g tras el proceso de esterificación.

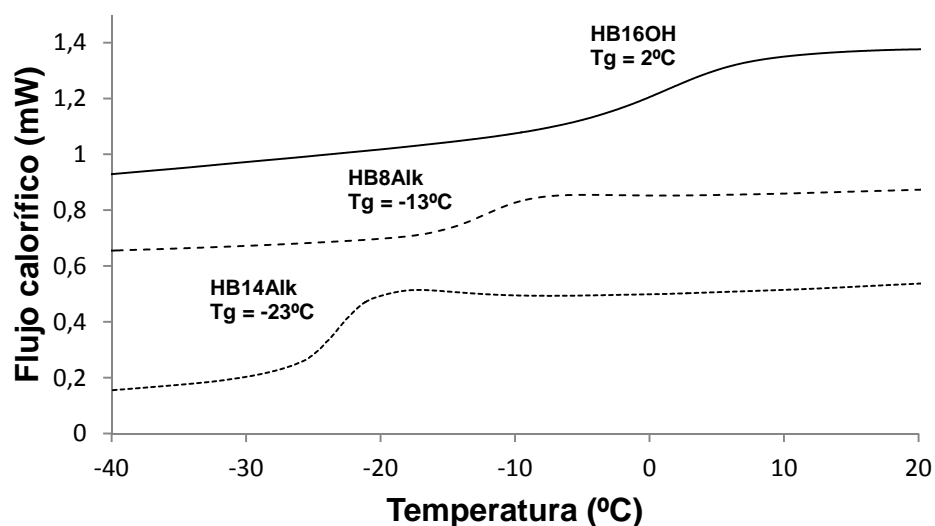


Fig. 2. Curvas de DSC para el precursor HB16OH y los macromonómeros HB8Alk y HB14Alk. La temperatura de transición vítrea está medida en el punto medio del salto de capacidad calorífica en el segundo calentamiento a 20°C / min.

6.2.2. PROCESO DE FOTORRETICULACIÓN

Tal y como se ha descrito en la introducción, está descrito en la bibliografía que la reacción radicalaria fotoiniciada de alquinos y tioles puede tener lugar sin necesidad de fotoiniciador. En concreto se han descrito irradiando a longitudes de onda en torno a 250 nm.²⁵ Esto puede resultar interesante en la preparación de biomateriales ya que el fotoiniciador, o sus productos de descomposición, pueden producir una respuesta

²⁵ Cramer, N.B., Scott, J.P., Bowman, C.N. *Macromolecules*, **2002**, *35*, 5361-5365.

inflamatoria.²⁶ Con el fin de comprobar esta reactividad y estudiar la posibilidad de llevar a cabo el proceso de fotorreticulación evitando el uso del fotoiniciador, se preparó una película a partir de una formulación que contenía únicamente el macromonómero con grupos alquino y el reticulante con grupos tiol multifuncional (con los grupos reactivos en cantidades estequiométricas que se indica como relación 1-2 de alquino-tiol) disueltos en diclorometano (DCM). La película, preparada por deposición de la disolución y evaporación del disolvente, se irradió durante 2 min con luz UV en el rango de 350-450 nm ya que el proceso de estructuración se realiza con un láser de 405 nm, tal y como se ha descrito en el capítulo 4, y se requiere un proceso de fotorreticulación eficiente a longitudes de onda próximas a este valor. La reacción se caracterizó por espectroscopia IR. Estas películas muestran una banda alrededor de 3280 cm^{-1} atribuida a la vibración del enlace $C_{sp}-H$ del grupo alquino, y otra alrededor de 2570 cm^{-1} atribuida a la vibración del enlace S-H del grupo tiol, que deberían verse modificadas si se produce reacción entre los dos grupos funcionales. Sin embargo, tal y como puede verse en la figura 3, no se aprecia reacción significativa ya que las bandas $C_{sp}-H$ y S-H mantienen su intensidad o disminuye poco significativamente cuando se irradia la película sin fotoiniciador a temperatura ambiente y a la longitud de onda mencionada.

²⁶ Fridovich, I. *J. Exp. Biol.*, **1998**, *201*, 1203-1209.

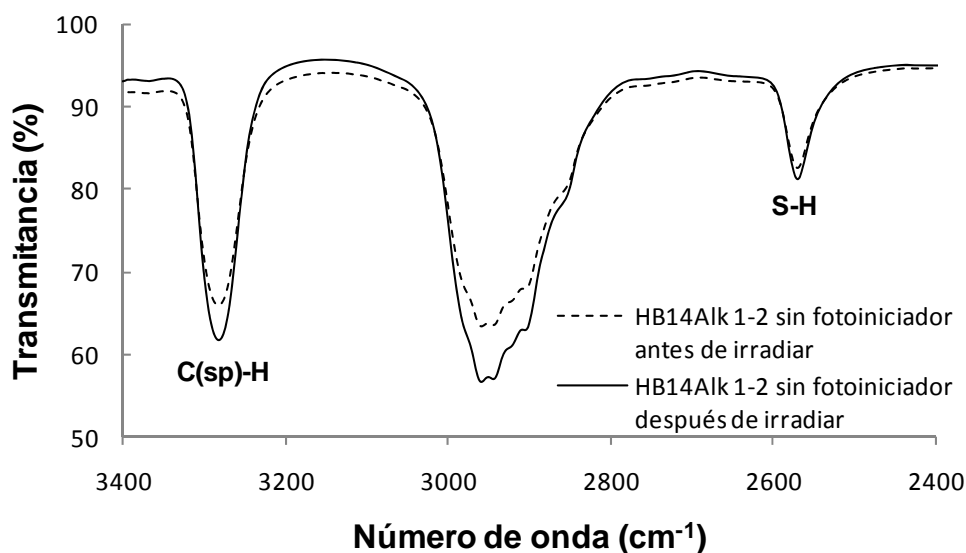


Fig. 3. Espectro IR de una película fotorreticulable de HB14Alk 1-2 (relación estequiométrica de alquino-tiol) sin fotoiniciador antes de irradiar (línea continua) y después de irradiar (línea discontinua) durante 2 min con luz UV en el rango de 350-450 nm y con una intensidad de 160 mW/cm^2 (ver parte experimental).

Dado que el sistema no polimerizó de manera efectiva, se añadió fotoiniciador a las formulaciones utilizadas para preparar las películas fotorreticulables. Como fotoiniciador se empleó el Irgacure 369 (figura 4) que absorbe alrededor de 365 nm como es el Irgacure 369. Para ello se prepararon películas a partir de formulaciones fotorreticulables conteniendo el macromonómero con grupos alquino, el reticulante con grupos tiol y un 3% del fotoiniciador Irgacure 369, todos ellos disueltos en diclorometano (DCM). Se pueden conseguir materiales con distinto grado de reticulación modificando la composición química de la mezcla fotorreticulable. Con este propósito se prepararon, para cada macromonómero, formulaciones con cantidades estequiométricas de grupo alquino y tiol o con exceso de grupos alquino. Puesto que cada grupo alquino puede reaccionar con 2 grupos tiol, las formulaciones con

composición estequiométrica se prepararon con una relación alquino : tiol de 1:2 y fueron codificadas como HB8Alk 1-2 y HB14Alk 1-2 respectivamente. Por su parte, las formulaciones con exceso de grupos alquino se prepararon con una relación alquino / tiol 1:1 y fueron codificadas como HB8Alk 1-1 y HB14Alk 1-1 respectivamente.

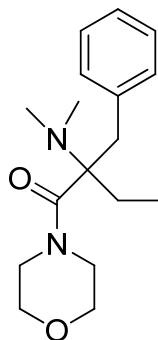


Fig. 4. Estructura química del fotoiniciador Irgacure 369.

Todas las formulaciones resultaron ser estables en disolución de DCM a temperatura ambiente y en ausencia de luz. No obstante, una vez preparada una película por deposición-evaporación de la disolución de DCM, se puede observar un cambio de solubilidad al cabo de unas horas incluso en ausencia de luz. Este hecho puede atribuirse a un proceso de reticulación iniciado térmicamente. Con el fin de comprobar esta hipótesis, se realizó un estudio por espectroscopia IR en películas de HB14Alk 1-2 como modelo. Tal y como se observa en la figura 5, las señales de los grupos alquino del macromonómero y de los grupos tiol del reticulante disminuyen ligeramente en intensidad tras almacenar una película durante 24 h en oscuridad y temperatura ambiente. Esto indica que los grupos tiol y alquino han reaccionado parcialmente incluso en ausencia de luz. Por este motivo, las películas son procesadas con luz inmediatamente después de su preparación para evitar reacciones térmicas no deseadas, desacoplando de este modo la reacción fotoinducida y la térmica. Esto es importante ya

que como se verá más adelante, es posible un lavado selectivo con disolvente de las zonas no irradiadas en los experimentos de estructuración con luz.

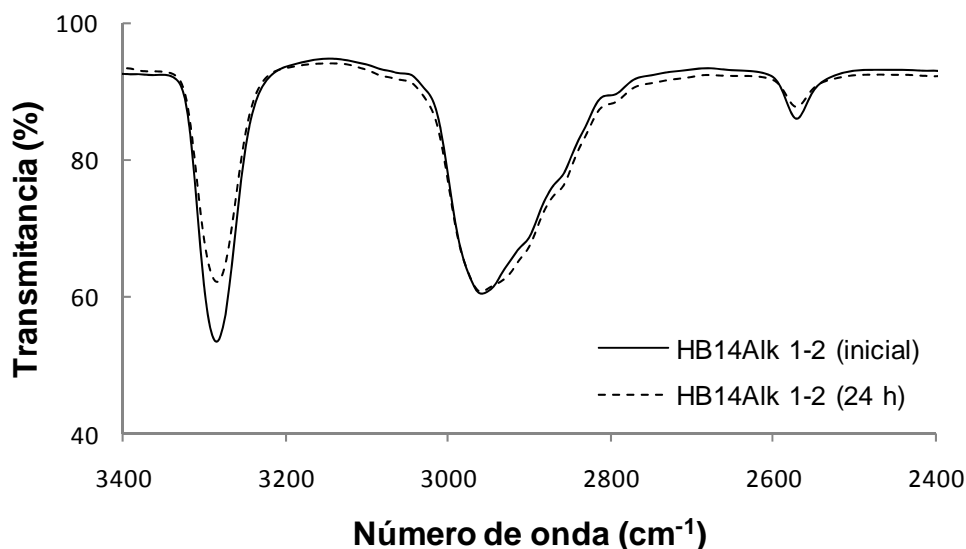


Fig. 5. Evolución del espectro de IR de una película de HB14Alk 1-2 almacenada durante 24 h a temperatura ambiente y ausencia de luz.

Puede verse en los espectros de la figura 6.a como, al añadir fotoiniciador y bajo las mismas condiciones de irradiación utilizadas en el experimento sin fotoiniciador descrito anteriormente, la evolución del proceso de fotopolimerización en películas de HB14Alk 1-2 es mucho mayor que en ausencia de fotoiniciador, ya que las bandas de los grupos reactivos sufren un mayor cambio de intensidad. Estos estudios se extendieron también al resto de formulaciones fotorreticulables (figuras 6.b, 6.c y 6.d) obteniéndose resultados análogos y demostraron en todos los casos la necesidad de un fotoiniciador para que el proceso se lleve a cabo de forma eficaz con una luz UV en el rango de 350-450 nm.

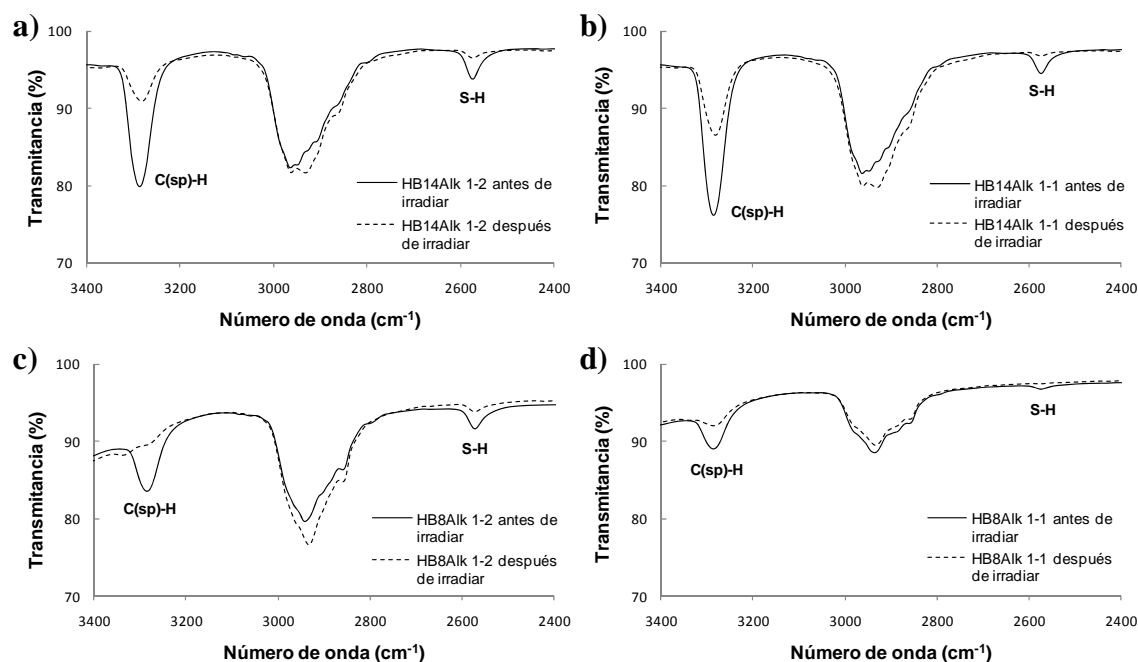


Fig. 6. Espectros IR del HB14Alk 1-2 (a), HB14Alk 1-1 (b), HB8Alk 1-2 (c) y HB8Alk 1-1 (d) antes de irradiar (línea continua) y después de irradiar (línea discontinua) con luz UV durante 2 min.

En las formulaciones HB8Alk 1-1 y HB14Alk 1-1 la señal de los grupos alquino (3280 cm^{-1}) no llega a desaparecer porque estos grupos están en exceso respecto a los grupos tiol (cada grupo tiol reacciona con dos grupos alquino). No obstante, esta banda tampoco desaparece completamente en las formulaciones HB8Alk 1-2 y HB14Alk 1-2, en las que los grupos alquino y tiol están en cantidades estequiométricas. Este hecho se atribuye a un incremento en la T_g del material conforme avanza el proceso de fotorreticulación y por ende una menor difusión de los radicales implicados en el proceso.¹² El valor de la T_g del material fotorreticulable antes de entrecruzarse no se determinó de forma exacta ya que, durante el ensayo de DSC tenía lugar la reticulación por vía térmica y la T_g no es realmente la correspondiente a la mezcla inicial. En todo caso, como referencia se compara la T_g de los materiales entrecruzados con la de los macromonómero de partida, que debería ser mayor que la de la mezcla ya que en esta, el

reticulante de bajo peso molecular, y en menor medida el fotoiniciador, actúa como plastificantes y rebajan la T_g . En la tabla 3 pueden verse los valores de T_g de los macromonómeros iniciales y de los materiales reticulados. Puede verse como el aumento de la T_g es mayor para los componentes con macromonómeros con mayor número de grupos alquino (HB14Alk 1-1 y HB14Alk 1-2) lo que se atribuye a un mayor grado de reticulación. Se puede ver también que, para un mismo macromonómero, la reticulación con una mayor cantidad de grupos alquino (formulaciones HB8Alk 1-2 y HB14Alk 1-2) resulta en materiales con T_g más elevada debido al mayor grado de entrecruzamiento.

Tabla 3. Temperaturas de transición vítrea de los dos macromonómeros (HB8Alk y HB14Alk) y de las diferentes formulaciones una vez reticuladas con luz UV.

Compuesto	T_g	Compuesto	T_g
HB8Alk	-13°C	HB14Alk	-23°C
HB8Alk 1-1 (UV)	13°C	HB14Alk 1-1 (UV)	31°C
HB8Alk 1-2 (UV)	24°C	HB14Alk 1-2 (UV)	41°C

Para comprobar la influencia de llevar a cabo el proceso de reticulación por encima de transición vítrea, se sometió a una película de HB14Alk 1-2, fotorreticulada durante 2 min a temperatura ambiente, a una irradiación adicional de 10 min a temperatura ambiente. Tras este proceso no se vio evolución del espectro de IR. No obstante, una posterior irradiación a 150°C (temperatura superior a la temperatura de transición vítrea) durante otros 10 min provocó una nueva disminución de las bandas de absorción de los grupos alquino (figura 7). Este hecho demuestra que al calentar a

temperaturas por encima de la T_g se favorece la movilidad molecular y los grupos alquino y tiol pueden seguir reaccionado (por vía fotoquímica o vía térmica). Para los estudios celulares se utilizaron películas fotorreticuladas a temperatura ambiente ya que las redes poliméricas obtenidas de esta forma son estables y no solubles en la mezcla de disolventes utilizada para la película sin irradiar, lo que permite llevar a cabo los procesos de estructuración con luz que serán descritos más adelante en este mismo apartado.

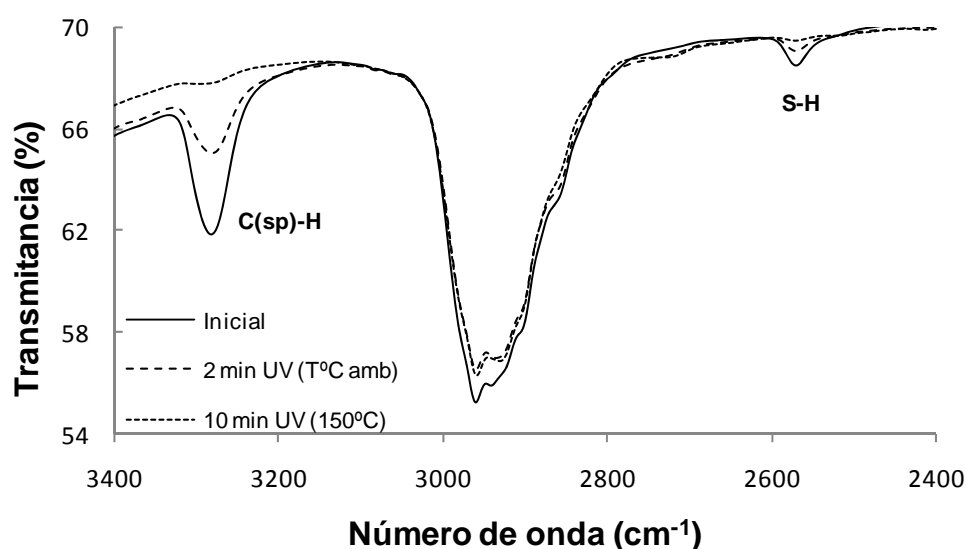


Fig. 7. Espectros IR de una película fotorreticulable de HB14Alk 1-2 antes de irradiar (línea continua), tras 2 min de irradiación a temperatura ambiente (línea discontinua) y tras 10 min de irradiación a 150°C (línea de puntos).

Respecto a la cantidad de grupos tiol, puede verse en los espectros de IR de la figura 6 que un defecto en la cantidad de estos grupos en la formulación hace que la señal remanente de los grupos alquino sea más intensa tras la irradiación como puede verse al comparar el espectro de la película HB14Alk 1-2 (figura 6.a) con la de HB14Alk 1-1 (figura 6.b) o el espectro de la película HB8Alk 1-2 (figura 6.c) con el de

HB8Alk 1-1 (figura 6.d). Esto parece indicar que los grupos tiol actúan como reactivo limitante en las formulaciones con exceso de alquino (formulaciones 1-1) y que los grupos alquino no reaccionan ni polimerizan entre ellos por reacción radicalaria en las condiciones de trabajo (proceso que puede tener lugar por ejemplo en la química de tioles cuando hay defecto de tioles). Para comprobar que en efecto no hay polimerización entre los grupos alquino se llevó a cabo la irradiación con luz UV de una película preparada a partir de una disolución del macromonomero con fotoiniciador pero sin reticulante tetratiol. En estas muestras no se vio evolución de la señal de los grupos alquino tras los dos minutos de irradiación con luz UV utilizado en los experimentos anteriores (figura 8). Por lo tanto se excluye la formación de cadenas policarbonadas.

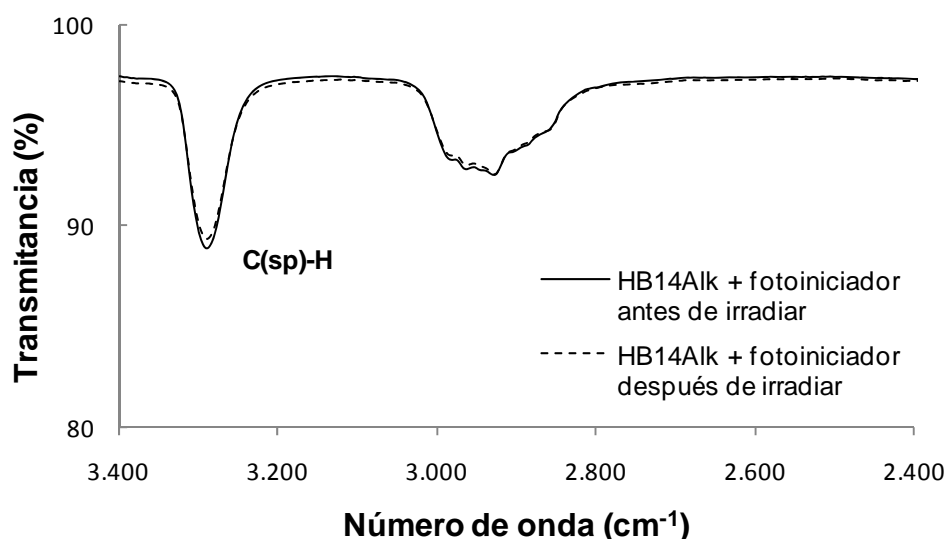


Fig. 8. Espectros IR de una película fotorreticulable de HB14Alk 1-2 con Irgacure 369 y sin reticulante con grupos tiol antes de irradiar (línea continua) y después de irradiar (línea discontinua) con luz UV.

También se llevaron a cabo estudios de fotocalorimetría para seguir el proceso de fotorreticulación en películas fotorreticulables de HB14Alk 1-2 (figura 9). Para ello se deposita el material en el fondo de una cápsula de aluminio para DSC abierta. Las

curvas de DSC mostraron un intenso pico exotérmico justo después de comenzar la irradiación que está asociado a la energía liberada en el proceso de fotorreticulación. Tal y como puede observarse la reacción comienza inmediatamente después de encender la lámpara y en unos pocos minutos (aprox. 2 min) se alcanza un *plateau* que indica que la conversión prácticamente no varía. El salto final de línea base observado al apagar la lámpara es consecuencia del calor suministrado por la lámpara tanto a la cápsula con la muestra como a la cápsula de referencia.

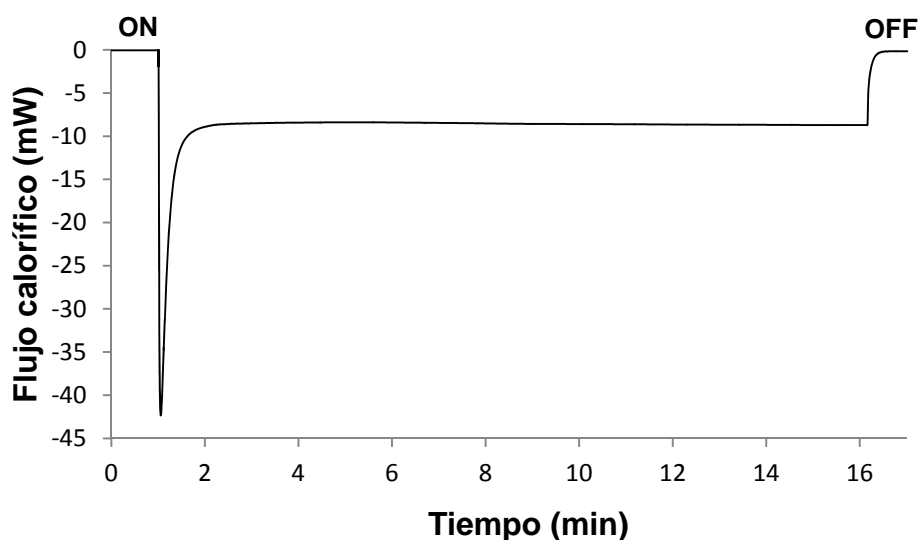


Fig. 9. Curva de fotoDSC obtenida al irradiar la mezcla fotorreticulable HB14Alk 1-2 a una temperatura constante de 25°C.

6.2.3. ESTUDIOS DE BIOCAMPATIBILIDAD

La biocompatibilidad de los materiales resultantes del proceso de fotorreticulación (sobre los que se quiere estudiar el crecimiento celular) se estudió mediante ensayos de MTT. Al igual que en los estudios presentados en los capítulos anteriores, estos experimentos se llevaron a cabo con dos líneas celulares distintas:

células HeLa y fibroblastos COS-7, siendo los tiempos de cultivo utilizados de 24, 48 y 72 h.

Los estudios de MTT representados en la figura 10 indican que ninguno de los materiales obtenidos resulta tóxico como sustrato para el cultivo celular ya que los porcentajes de viabilidad celular, para todos los materiales y con ambas líneas celulares, están muy próximos al valor de referencia (100%), que corresponde a sustratos de vidrio utilizados como control.

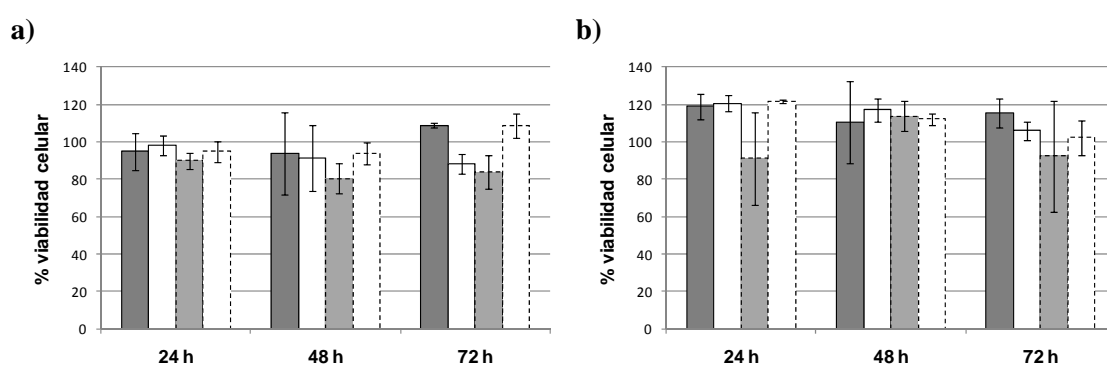


Fig. 10. Porcentaje de viabilidad celular de células tumorales HeLa (a) y fibroblastos COS-7 (b) cultivadas sobre películas poliméricas fotorreticuladas sin estructurar de HB14Alk 1-2 (barra gris oscuro con línea continua), HB14Alk 1-1 (barra blanca con línea continua), HB8Alk 1-2 (barra gris claro con línea discontinua) y HB8Alk 1-1 (barra blanca con línea discontinua).

6.2.4. ESTRUCTURACIÓN CON LUZ

El carácter fotoinducido de la reacción nos permite la aplicación de técnicas fotolitográficas para conseguir una estructuración del material en la escala micrométrica que, como se ha comentado en capítulos anteriores, puede servir para influir en la adhesión y proliferación celular. Para explorar esta posibilidad se generaron inicialmente estructuras de distintas topografías a partir de películas fotorreticulables de

HB14Alk 1-2 depositadas sobre sustratos de vidrio. Se eligió inicialmente la formulación HB14Alk 1-2, basada en el macromonómero con un mayor grado de funcionalización con grupos alquino y grupos tiol en cantidad estequiométrica, que resulta en materiales más entrecruzados que potencialmente van a resistir mejor el proceso de lavado con un disolvente selectivo tras la estructuración con luz. Esta estructuración se llevó a cabo por escritura directa con láser (DLW) usando el montaje descrito en el apartado 4.2.3 del capítulo 4, un lavado posterior de la zona no irradiada con una mezcla etanol / acetona 1:1 y un lavado final con un flujo de etanol.

En la figura 11 se observan imágenes de topografía obtenidas con un microscopio confocal de diversas estructuras obtenidas mediante DLW a partir de películas de la formulación fotorreticulable HB14Alk 1-2. Controlando el movimiento del motor se consiguieron hacer estructuras consistentes en conjuntos líneas paralelas dispuestas perpendicularmente (figura 11.a) o con un ángulo diferente de 90° (figura 11.b). Se generaron estructuras con diferentes alturas y anchura de línea. Puede verse en las imágenes de la figura 11 que las zonas donde se cruzan dos líneas son ligeramente más altas que el resto de la estructura. Esto es debido a que en esa zona el haz láser ha incidido dos veces aumentándose la dosis de luz, lo que resulta en un mayor grado de reticulación en esa zona por lo que resiste mejor el lavado selectivo. Al no haber reaccionado completamente en las condiciones de irradiación utilizadas en el proceso de escritura láser, parte del material es eliminado durante el proceso de lavado. No obstante, se ha estimado por perfilometría que dicho descenso de la altura solamente supone un 10% del grosor inicial aproximadamente.

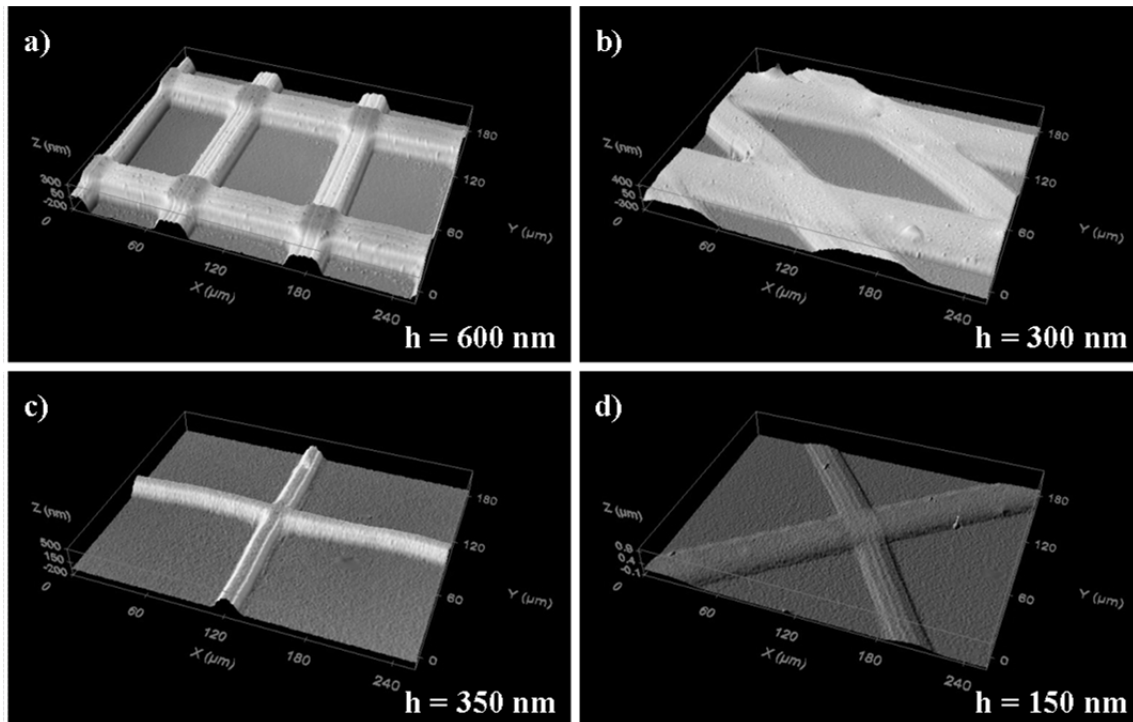


Fig. 11. Imágenes de topografía obtenidas con un microscopio confocal en las que se puede observar la topografía de estructuras poliméricas de geometría controlada obtenidas por DLW a partir de películas fotorreticulables de HB14Alk 1-2. La altura (h) aproximada de las estructuras está indicada en la esquina inferior derecha.

Tras estudiar la posibilidad de estructurar el material mediante DLW en el fotopolímero HB14Alk 1-2, se aplicó esta técnica al resto de formulaciones preparadas para obtener microestructuras con distinta composición química. En la figura 12 pueden verse algunas estructuras obtenidas para las distintas formulaciones procesadas de la misma forma que las películas de HB14Alk 1-2 (representadas en la figura 11).

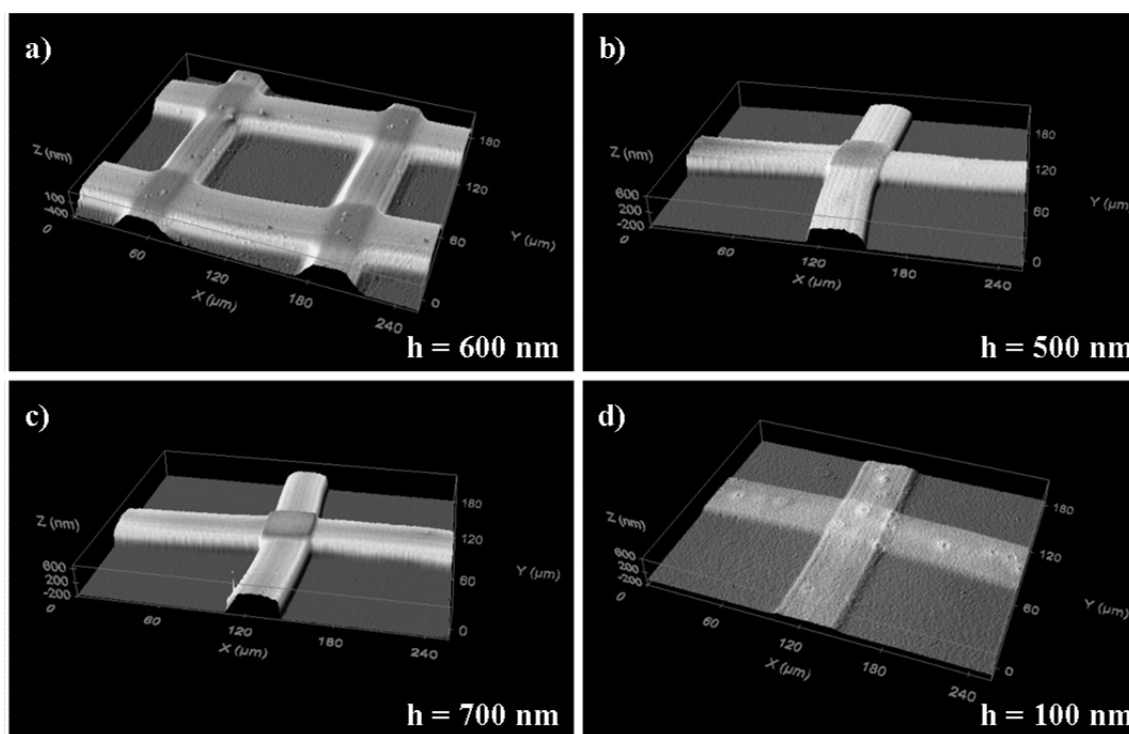


Fig. 12. Imágenes de topografía obtenidas con un microscopio confocal en las que se pueden observar estructuras generadas por DLW en películas fotorreticulables de HB14Alk 1-2 (a), HB14Alk 1-1 (b), HB8Alk 1-2 (c) y HB8Alk 1-1 (d). La altura (h) aproximada de las estructuras está indicada en la esquina inferior derecha de cada imagen.

6.2.5. ESTUDIOS DE ADHESIÓN CELULAR

Para estudiar los procesos de adhesión y proliferación celular sobre las estructuras poliméricas generadas, se cultivaron sobre éstas células de las dos líneas elegidas (células tumorales HeLa y fibroblastos COS-7). Se escogió el material HB14Alk 1-2 para llevar a cabo los estudios iniciales en estructuras de líneas con alturas en torno a los 500 nm (medidas por perfilometría) y anchuras de unos 30-50 μm , en el orden de las dimensiones celulares. El cultivo de las células sobre dichas microestructuras se visualizó mediante microscopía de contraste de fase. En la figura 13 se recogen imágenes para las células tumorales HeLa tras 24 horas de cultivo. En la

figura 13.a puede verse como estas células presentan una morfología triangular, típica de esta línea celular, cuando son cultivadas en una película del material sin estructurar (películas totalmente expuesta a la luz UV). Cuando las células HeLa son cultivadas sobre estructuras poliméricas con anchuras en torno al tamaño celular (30-50 μm), las células muestran tras 24 h de cultivo una morfología alargada en la dirección de las líneas poliméricas tal y como puede observarse en las figuras 13.b y 13.c. Las células se encuentran preferentemente sobre la línea polimérica de manera que la interacción es máxima con el material y mínima con el vidrio (figuras 13.b y 13.c).

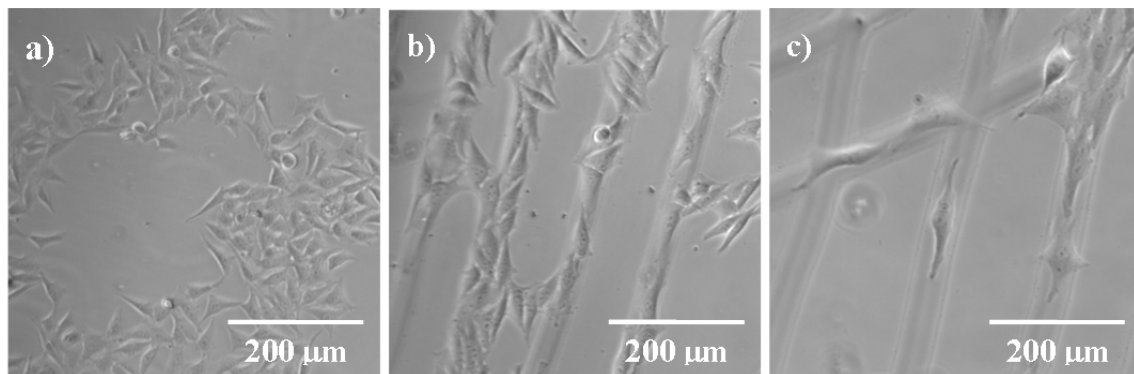


Fig. 13. Imágenes de contraste de fase de células tumorales HeLa cultivadas sobre una película de HB14Alk 1-2 no estructurada (a) y sobre estructuras poliméricas generadas por DLW (b, c).

Se llevaron a cabo estudios similares también con fibroblastos COS-7 como ejemplo de línea celular sana. En la figura 14 puede verse como los fibroblastos también muestran una adhesión preferencial por el material tras 24 h de cultivo, pero no experimentan cambio en su morfología típica redondeada y extendida en el plano (véase como referencia la célula sobre el sustrato de vidrio en la figura 14.a). Esta diferencia se atribuye a que las células tumorales HeLa tienen una mayor movilidad que los fibroblastos COS-7 por lo que pueden deformar su citoplasma para adaptarse a la

estructura.²⁷ Los fibroblastos sin embargo, al ser menos móviles, no tienen esta facilidad para deformarse.

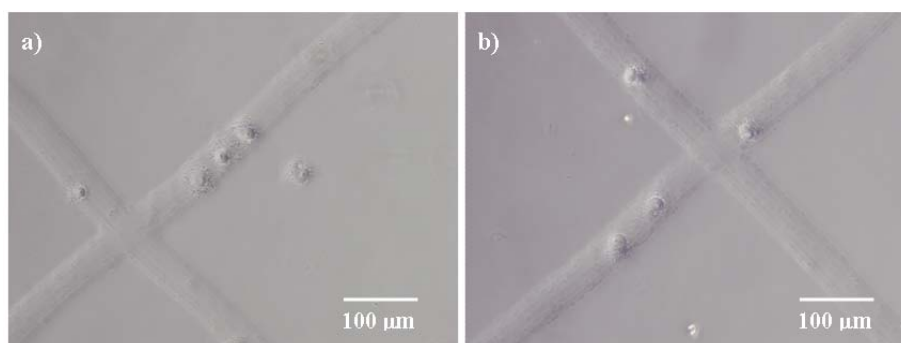


Fig. 14. Imágenes de contraste de fase de fibroblastos COS-7 cultivados sobre estructuras de HB14Alk 1-2 generadas por DLW.

Se llevaron a cabo estudios análogos con películas del resto de formulaciones de tiol-inos preparadas (HB8Alk 1-1, HB8Alk 1-2 y HB14Alk1-1). Estos materiales, con distinto grado de entrecruzamiento, tienen propiedades físico-químicas diferentes que pueden afectar a la adhesión celular.^{28, 29} Para estudiar esta posibilidad se generaron películas estructuradas de los diferentes materiales con parámetros topográficos análogos a los anteriores (alturas próximas a los 500 nm y anchuras de 30-50 μm) y se observó un comportamiento parecido de ambas líneas celulares en todos ellos y que se correspondía con el observado en estructuras de HB14Alk 1-2. Por tanto, parece que para los materiales estudiados las propiedades químicas del material son análogas o las diferencias entre ellos no parecen influir en la adhesión de las distintas líneas celulares.

Para un mejor entendimiento de cómo influyen los parámetros topográficos de la estructura en la adhesión y proliferación celular, se realizaron estudios en los que se

²⁷ Small, J.V., Anderson, K., Rottner, K. *Biosci. Rep.*, **1996**, *16*, 351-368.

²⁸ Shoichet, M.S. *Macromolecules*, **2010**, *43*, 581-591.

²⁹ Scharnagl, N., Lee, S., Hiebl, B., Sisson, A., Lendlein, A. *J. Mater. Chem.*, **2010**, *20*, 8789-8802.

cultivaron las dos líneas celulares sobre estructuras de HB14Alk 1-2 (como modelo) con diferente altura y anchura de las líneas poliméricas que conforman la estructura.

Para estudiar la **influencia de la altura** en el comportamiento celular se generaron patrones poliméricos de distintas alturas desde cientos de nm hasta varias micras y con una anchura aproximada de 30-50 μm , sobre los que se cultivaron las células. Posteriormente éstas fueron fijadas con formaldehído y observadas mediante microscopía confocal. Para este estudio se escogió inicialmente este rango de anchuras porque está en el orden de las dimensiones celulares y se ha observado que puede dirigir el crecimiento celular (figuras 13 y 14).

Cuando se cultivan células tumorales HeLa sobre una estructura polimérica con una altura de unos pocos cientos de nanómetros encontramos que, al cabo de 24 h, estas se encuentran fundamentalmente sobre las líneas de material polimérico y con una morfología alargada, adquiriendo una orientación paralela a la estructura polimérica tal y como puede verse en la figura 15.a y en las figuras 13.b y 13.c descritas anteriormente. En los cultivos realizados sobre microestructuras con alturas algo mayores, del orden de la micra, las células se encuentran (tras 24 h de cultivo), fundamentalmente, con una morfología y orientación similar a la mostrada en la figura 15.a) o bien parcialmente adheridas al vidrio y a la parte superior de la estructura polimérica. Estas últimas presentan una disposición y morfología como la mostrada en la figura 15.b. Por último, cuando el cultivo fue realizado sobre microestructuras con alturas de varias micras, las células al cabo de 24 h de cultivo se encuentran mayoritariamente adheridas al vidrio y a la base de la estructura polimérica. Estas células presentan una morfología alargada y una orientación en la dirección de la microestructura (figura 15.d). Solamente un pequeño porcentaje de las células se

encuentran sobre la microestructura con una morfología estirada a lo largo de la línea (figura 15.d) al igual que lo observado para alturas menores.

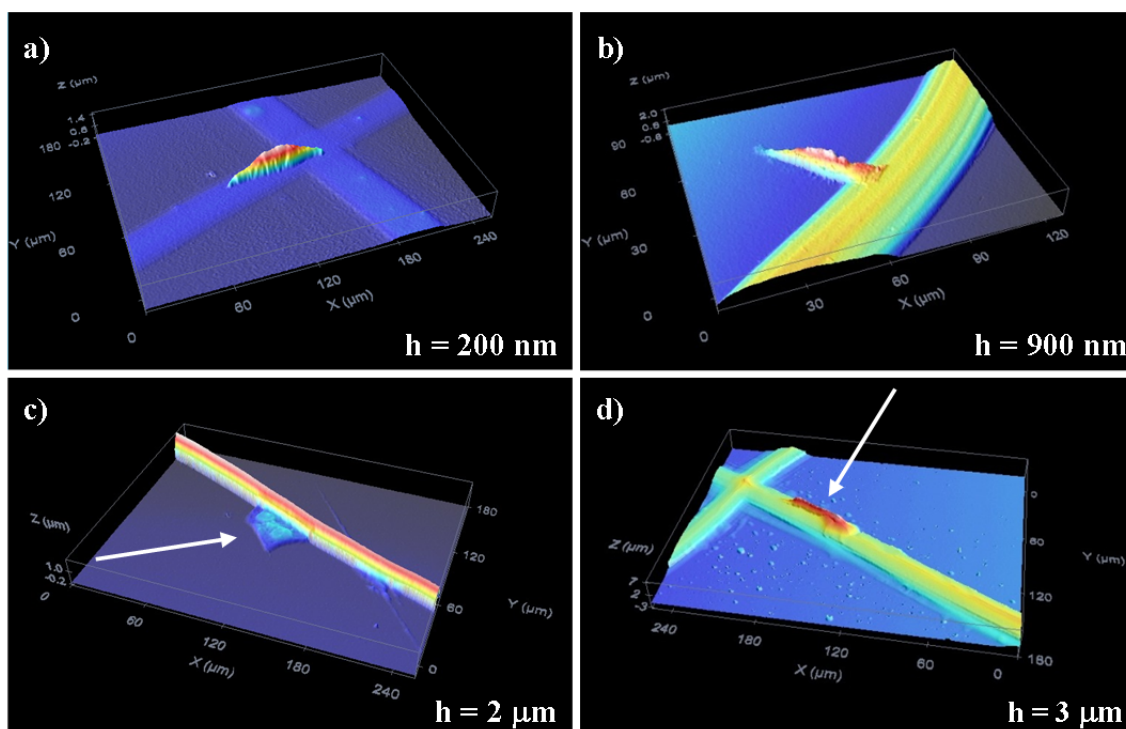


Fig. 15. Imágenes de topografía obtenidas con un microscopio confocal en células tumorales HeLa cultivadas sobre estructuras generadas por DLW en películas fotorreticulables de HB14Alk 1-2 con altura variable y anchura aproximada de 30-50 μm . La altura (h) aproximada de las estructuras está indicada en la esquina inferior derecha. En las figuras 15.c y 15.d se indica con una flecha blanca la localización de las células.

Para los fibroblastos COS-7 se observó un comportamiento similar ya que, al ser cultivados en sustratos con estructuras poliméricas de poca altura (figuras 16.a y 16.b), al cabo de 24 h los encontramos adheridos preferentemente al material polimérico, aunque sin deformar su morfología tal y como se había observado previamente por microscopía de contraste de fase (figura 14). Cuando las células son cultivadas en estructuras próximas a la micra se observan, al igual que en las células HeLa, células

adheridas parcialmente al vidrio y a la parte superior de la estructura (figura 16.c). Por su parte, cuando la estructura tiene una altura de varias micras las células se encuentran fundamentalmente adheridas al vidrio interaccionando con la base de la estructura pero no con la parte superior de la misma (figura 16.d).

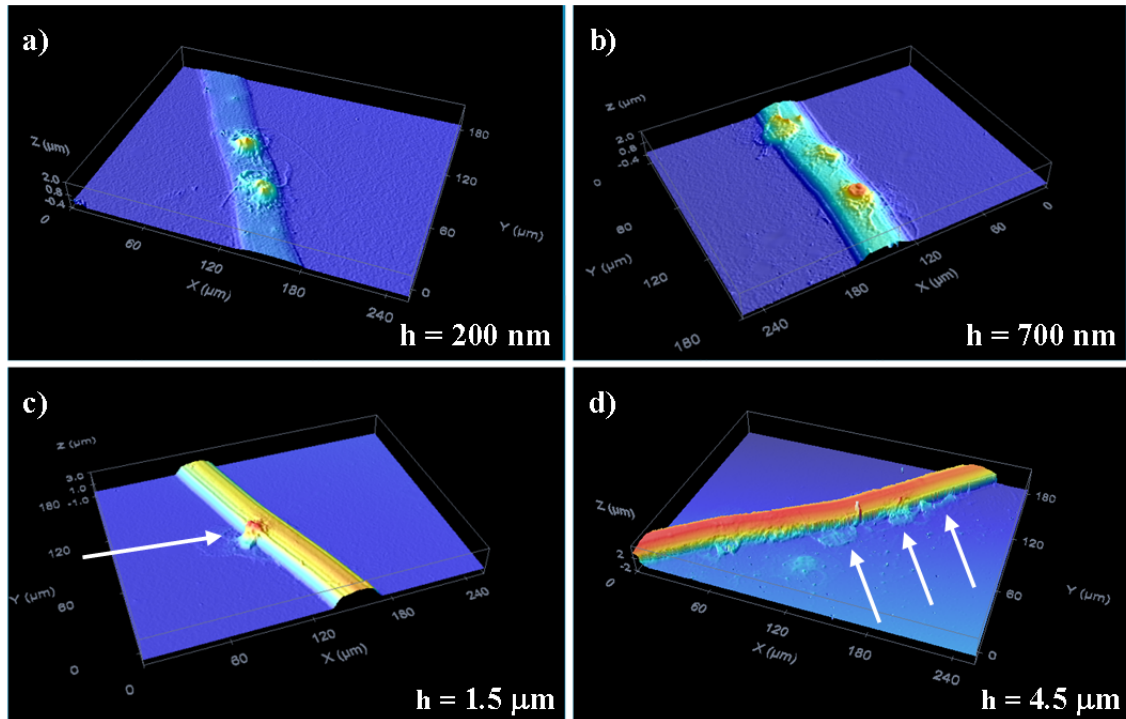


Fig. 16. Imágenes de topografía obtenidas con un microscopio confocal en fibroblastos COS-7 cultivadas sobre estructuras generadas por DLW en películas fotorreticulables de HB14Alk 1-2 con altura variable y anchura aproximada de 30-50 μm . La altura (h) aproximada de las estructuras está indicada en la esquina inferior derecha. En las figuras 16.c y 16.d se indica con una flecha blanca la localización de las células.

Estos estudios confirman que las células tienen una clara preferencia por el material frente al vidrio ya que, tras haber sido depositadas al azar sobre la muestra, tras 24 h de cultivo se encuentran interaccionando con la microestructura, que representa un área más pequeña que las zonas con sustrato de vidrio. Además, los resultados parecen indicar que la altura de la línea influye en la migración de la célula. Así, cuando la

altura de las líneas es pequeña, las células pueden migrar encima de la estructura aunque en los instantes iniciales tras el cultivo hayan quedado adheridas al vidrio. Es por ello que vemos las células preferentemente adheridas a la parte superior de la estructura polimérica (figuras 15.a, 16.a y 16.b). Cuando la altura de la estructura está próxima a la micra, no todas consiguen alcanzar la parte superior de la microestructura en el mismo tiempo de cultivo (figura 15.b y 16.c). Por otro lado, cuando las estructuras poliméricas son de varias micras las células se encuentran preferentemente adheridas al vidrio e interaccionando con la base de la estructura polimérica (figuras 15.c y 16.d). Esto parece indicar preferencia por el material pero el proceso de migración a la parte superior de la estructura no es posible debido a la altura de la misma. En estos casos, las células observadas en la parte superior posiblemente se hayan depositado sobre la microestructura durante el cultivo en suspensión, tal y como se aprecia para la célula de la figura 15.d.

Para comprobar esta hipótesis se monitorizaron cultivos de células HeLa, que fueron escogidas por su mayor movilidad respecto a los fibroblastos,²⁷ sobre estructuras poliméricas de HB14Alk 1-2 con diferentes alturas. Dicho estudio se llevó a cabo por microscopía secuencial en el que las células se cultivaron sobre los sustratos de vidrio con la estructura en una cámara acondicionada a 37°C y 5% de CO₂ acoplada a un microscopio. De esta forma se pudo capturar una secuencia de imágenes en distintos puntos y a distintos tiempos para poder seguir el comportamiento de las células. En la figura 17 se muestra una secuencia de imágenes correspondiente a un cultivo de células HeLa sobre un sustrato de vidrio con una estructura polimérica de unos 300 nm de altura aproximadamente según medidas de perfilometría. En la figura 17.a puede verse como, en los instantes iniciales del cultivo, algunas células cayeron encima de la microestructura mientras otras quedaron adheridas al vidrio. Puede verse como la célula

marcada con un círculo blanco, que está próxima a la estructura polimérica, migra del vidrio al material en un periodo aproximado de 1h 30 min (imágenes 17.a – 17.f). Tras subir encima de la estructura polimérica la célula adquiere una morfología alargada paralela a la dirección de la estructura, lo que concuerda con la morfología celular observada en las fotografías de contraste de fase de la figura 13.

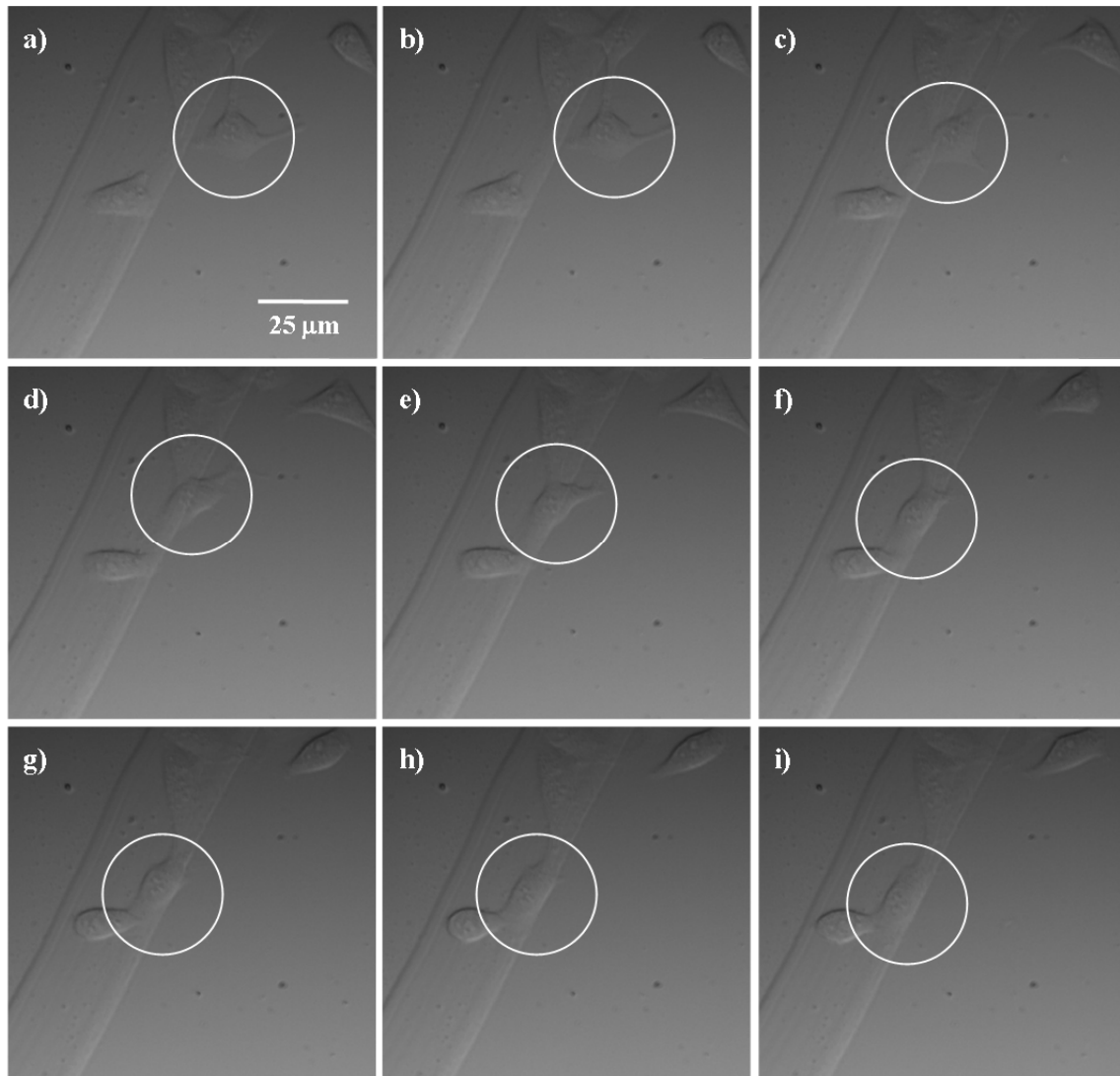


Fig. 17. Secuencia de imágenes de contraste de interferencia diferencial tomadas durante el cultivo *in vitro* de células tumorales HeLa sobre una estructura con $h = 300$ nm aproximadamente. Intervalo entre imágenes: 15 min.

Cuando las células son cultivadas en estructuras de mayor altura (en torno a la micra) también es posible la migración hasta la parte superior de la estructura polimérica tal y como puede verse en la figura 18 donde la altura de la estructura sobre la que se cultivan las células está próxima a la micra. Atendiendo a la escala de tiempos, la migración de la célula marcada con la flecha en la figura 18 se completa en aproximadamente unas 6-7 h, mientras que la célula que migra a la estructura polimérica de menor altura en la figura 17 lo hace en aproximadamente 1h 30 min. Esta diferencia de escala de tiempos de migración fue observada en diferentes cultivos y podría atribuirse a una mayor dificultad en el proceso de migración.

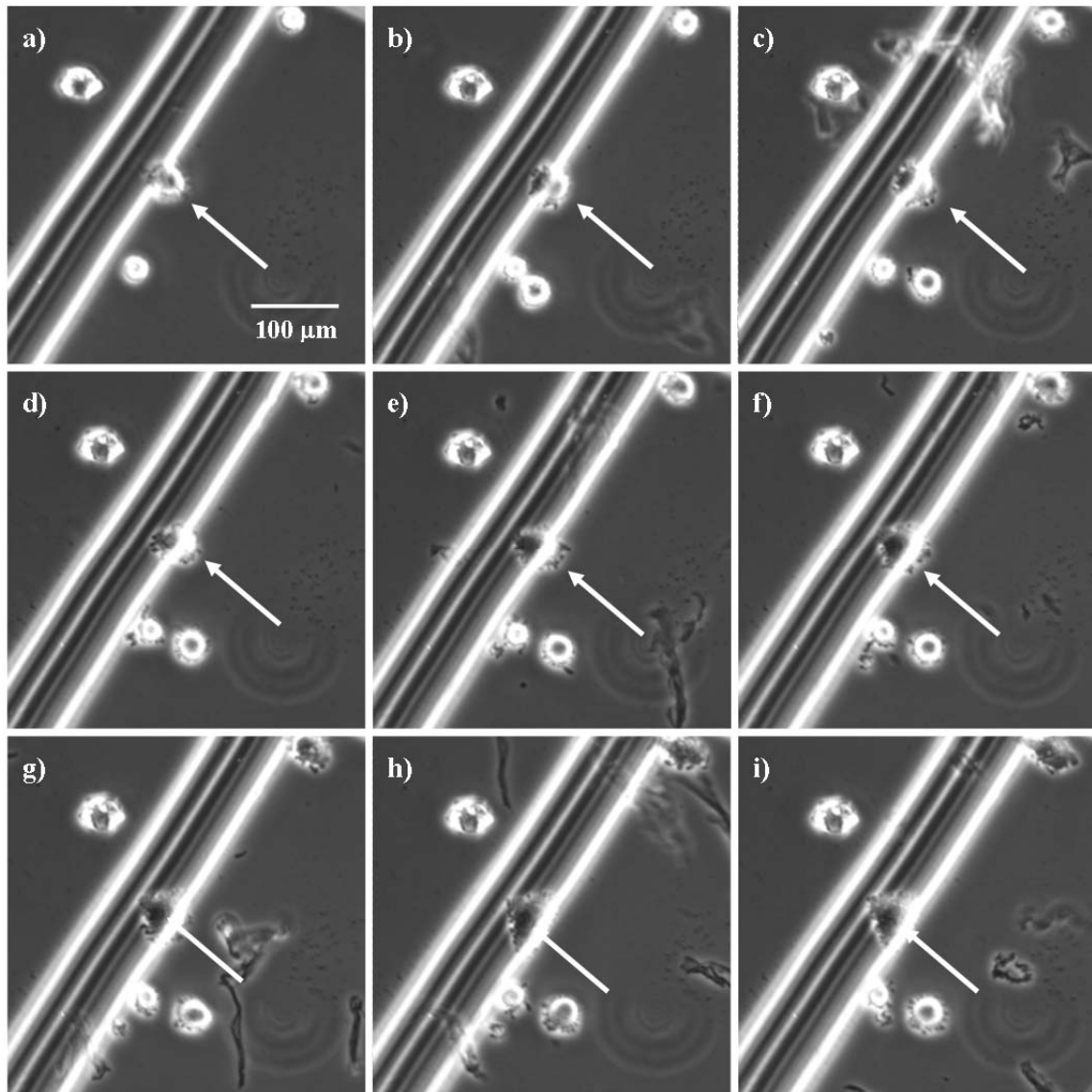


Fig. 18. Secuencia de imágenes de contraste de fase tomadas durante el cultivo *in vitro* de células HeLa sobre una estructura con una altura aproximada $h = 1 \mu\text{m}$. Intervalo entre imágenes: 45 min.

Tal y como se ha visto en las figuras 15 y 16 para HeLa y COS-7 respectivamente, cuando la altura de la microestructura polimérica es del orden de varias micras las células se encuentran mayoritariamente adheridas al vidrio interactuando con la base de la microestructura. Estudios de microscopía secuencial revelaron que las células migran a esta región de la microestructura sin llegar a subir a la parte superior de la misma. No obstante, en las observaciones llevadas a cabo se

registró un caso singular en el que una de estas células se suelta del sustrato y queda en suspensión para dar lugar a 2 células hijas (figuras 19.a – 19.d). Estas dos células, también en suspensión, pueden acceder más fácilmente a la parte superior de la microestructura quedando al final una de ellas sobre la estructura (figuras 19.e y 19.f)

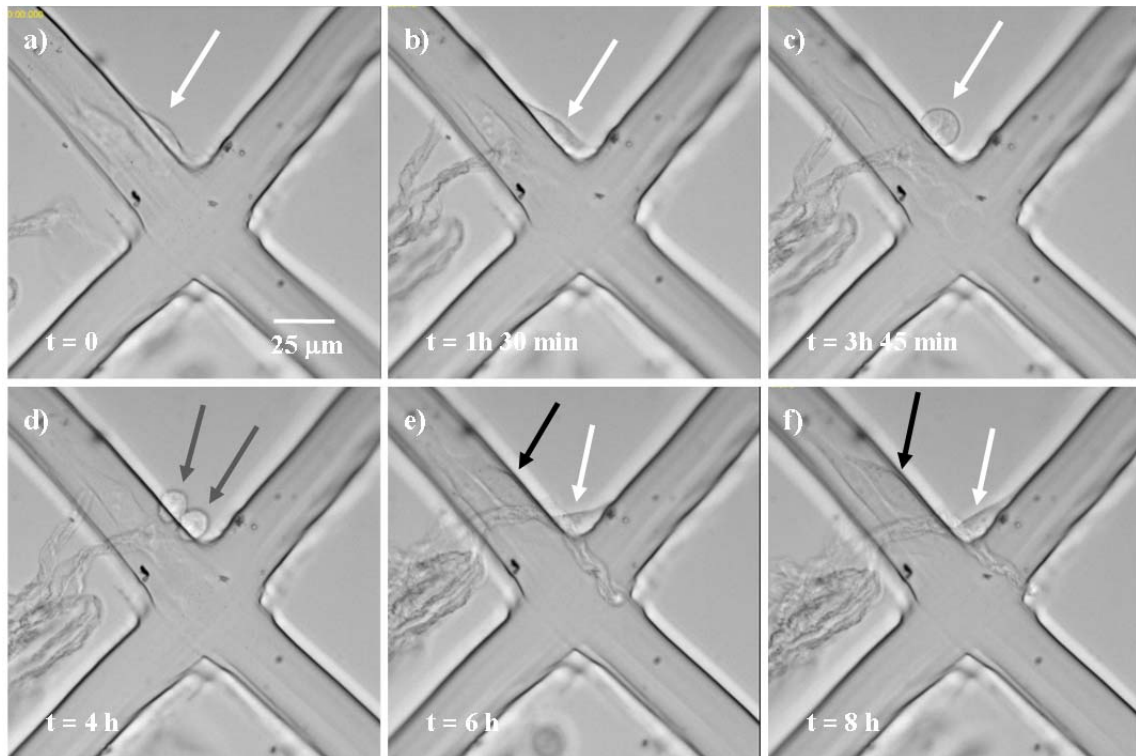


Fig. 19. Secuencia de imágenes de contraste de interferencia diferencial tomadas durante el cultivo *in vitro* de células tumorales HeLa sobre una estructura con líneas de una altura aproximada de 2 μm .

Estos estudios de microscopía secuencial confirman que la altura es un parámetro determinante en la migración celular desde el vidrio a la parte superior de la microestructura. Las células migran más fácilmente cuando la altura está en el orden de unos pocos cientos de nanómetros mientras que el proceso es más costoso para alturas próximas a la micra y poco factible en estructuras que superan aproximadamente las dos micras de altura.

Una vez estudiada la influencia de la altura en el comportamiento celular se llevaron a cabo estudios análogos en estructuras poliméricas con **líneas de distinta anchura** para comprobar cómo influye este parámetro en el comportamiento celular. Para ello se generaron estructuras poliméricas de alturas inferiores a la micra, para favorecer la migración celular desde el vidrio a la parte superior de la estructura polimérica, y anchuras comprendidas entre las 10 μm (menores que las dimensiones celulares) y las 100 μm (mayores que las dimensiones celulares).

Puede verse en la figura 20 que tanto las células tumorales HeLa como los fibroblastos COS-7, cuando se cultivan durante 24 h en patrones con anchura en torno a 10 μm (figuras 20.a y 20.c respectivamente) se disponen sobre la estructura polimérica y se adhieren selectivamente al material. En la figura 20.c puede verse que los fibroblastos COS-7, pese a ser menos móviles que las células HeLa, muestran también una cierta deformación en la dirección de la estructura polimérica. Este comportamiento, que no se había observado para líneas en el orden de las dimensiones celulares (30-50 μm), se atribuye a la afinidad que siente por el material de manera que la célula tiende a deformarse a pesar de que los fibroblastos normalmente adquieren una morfología extendida redondeada. En líneas poliméricas con anchuras superiores a las dimensiones celulares (en el orden de 100 μm de anchura), las células no muestran una orientación cuando están adheridas a la estructura polimérica (figura 20.b para células tumorales HeLa y 20.d para fibroblastos COS-7). Esto puede ser debido a que, una vez se encuentran sobre la estructura polimérica, sienten el entorno (parte superior de la estructura) como un sustrato plano y por lo tanto no tienen una respuesta direccional como la mostrada en estructuras de menor anchura. En estas líneas con anchuras próximas a los 100 μm se aprecia en ocasiones una superficie estriada con líneas paralelas a la estructura (figuras 20.b y 20.d) que puede deberse a inhomogeneidades de

la distribución de la intensidad en el haz, solamente apreciables en este rango de anchuras al estar el haz desfocalizado. En cualquier caso, no se ha visto influencia de esta rugosidad en el crecimiento celular ya que las células no adquieren una morfología dirigida, sino la morfología típica que adquieren en sustratos planos (triangular en el caso de las células HeLa, y redondeada en el caso de los fibroblastos COS-7).

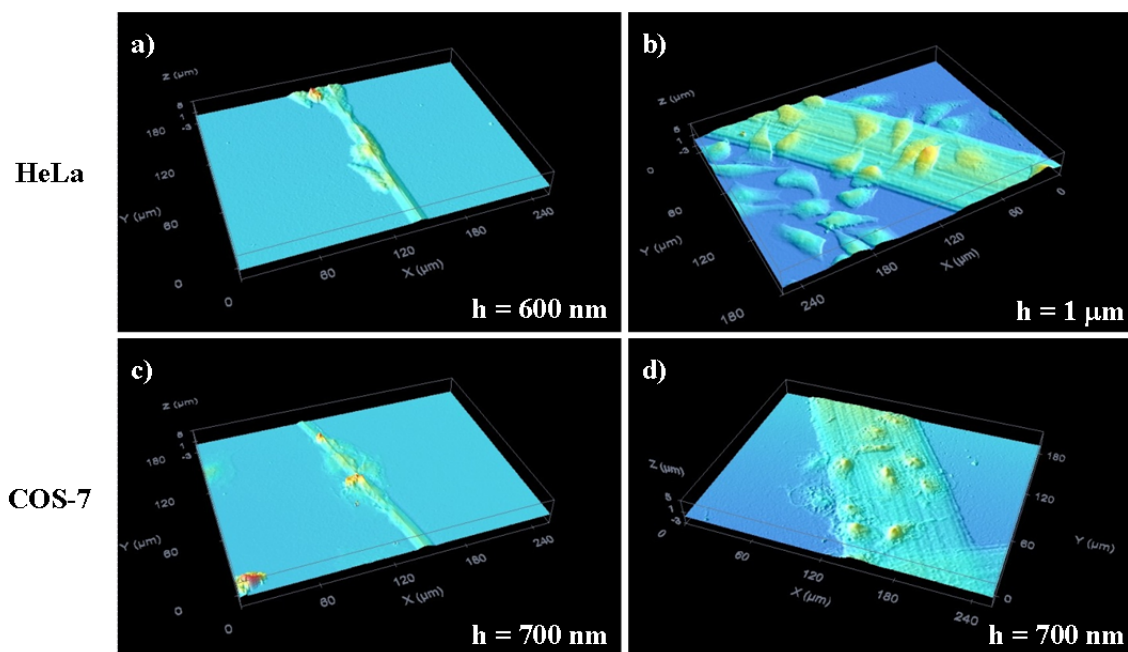


Fig. 20. Imágenes de topografía obtenidas con un microscopio confocal de células tumorales HeLa (a, b) y fibroblastos COS-7 (c, d) cultivados sobre estructuras generadas por DLW en películas fotorreticulables de HB14Alk 1-2 con anchuras de unos $10\ \mu\text{m}$ (a, c) y unos $100\ \mu\text{m}$ (b, d). La altura (h) aproximada de las estructuras está indicada en la esquina inferior derecha.

Para un mejor entendimiento de los procesos de adhesión celular se llevó a cabo el **marcaje fluorescente de las fibras de actina y vinculina** en células cultivadas sobre estructuras poliméricas de varios cientos de nanómetros de altura y anchura de $30\text{-}50\ \mu\text{m}$. Tal y como se ha mencionado en capítulos anteriores, el marcaje de estas proteínas mediante anticuerpos fluorescentes nos permite visualizar la morfología del

citoesqueleto celular en el caso de la actina, o los puntos focales de adhesión en el caso de la vinculina, que son los puntos por los que la célula se adhiere al sustrato.

En la figura 21 puede verse que las células tumorales HeLa dispuestas con una morfología estirada encima de la estructura polimérica muestran sobreexpresión de vinculina en los extremos de la célula (figura 21.a y 21.b y respectivas ampliaciones en las figuras 21.d y 21.e), lo que puede identificarse por los puntos y líneas con mayor intensidad de fluorescencia en estas zonas de la célula (figuras 21.d y 21.e). Esto indica que la célula, cuando deforma su citoplasma, está interaccionando con el material por los extremos de la célula. Las células tumorales HeLa pueden extender su citoplasma a mayores distancias que los fibroblastos COS-7 (menos móviles), lo que les permite establecer interacciones con áreas más lejanas y explorar el entorno más rápidamente. Por ejemplo, en la figura 21.a y su ampliación de la figura 21.d, puede verse una célula (señalada por una flecha) adherida a la línea polimérica que extiende su citoplasma hasta interaccionar por el extremo (tal y como puede verse por la sobreexpresión de vinculina de figura 21.d) con la línea polimérica perpendicular de la parte superior de la foto. Además, el hecho de no estar adheridas al sustrato más que por los extremos les confiere una gran movilidad ya que las células, cuando están muy adheridas al sustrato pierden movilidad.³⁰ Puede verse también en estas imágenes un alineamiento de las fibras de vinculina en la dirección de elongación que podría ayudar a soportar la tensión de esta morfología estirada.

En cuanto a la actina, en la figura 21.c puede verse como la célula adherida al vidrio (área en negro), al tener una morfología más extendida estas fibras están repartidas por el citoplasma. Sin embargo, la célula adherida a la estructura polimérica tiene una morfología alargada en la que la actina se acumula en largos filamentos

³⁰ Friedl, P., Zänker, K.S., Bröcker, E.V. *Micros. Res. Tech.*, **1998**, 43, 369-378.

paralelos a la dirección de elongación que pueden verse por su mayor intensidad de fluorescencia. Esta distribución de la actina, que también se observa en la célula de la figura 21.f, podría ayudar a soportar la tensión de la morfología alargada.

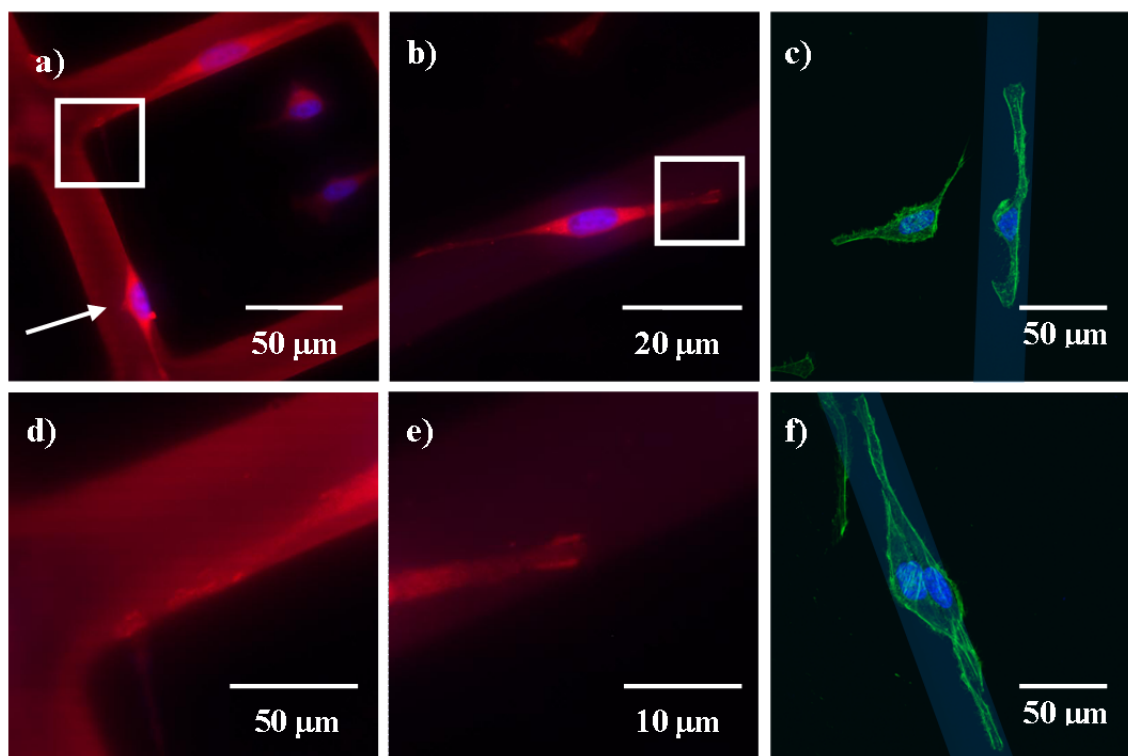


Fig. 21. Imágenes de microscopio confocal de un marcaje fluorescente de las fibras de vinculina (a, b, d, e) y actina (c, f) en células tumorales HeLa cultivadas sobre estructuras poliméricas de HB14Alk 1-2. Las zonas recuadradas en las figuras a y b han sido ampliadas en las figuras d y e respectivamente.

Los fibroblastos, según se ha visto por microscopía de contraste de fase y por microscopía confocal, se adhieren selectivamente a la estructura polimérica pero no sufren deformación de su citoplasma cuando se cultivan sobre estructuras con anchura en el orden de las dimensiones celulares. Esta morfología fue estudiada por marcaje fluorescente de las fibras de actina y vinculina para visualizar la distribución del citoesqueleto celular y los puntos de interacción con el sustrato, al igual que se hizo con las células HeLa. El marcaje de vinculina muestra sobreexpresión de esta proteína

(puntos rojos brillantes de la figura 22.a) por todo el citoplasma de la célula, lo que indica que la interacción se está produciendo por todo el citoplasma. Se puede ver además que los puntos focales de adhesión no muestran ningún tipo de orientación preferente ya que la célula tampoco lo muestra. Esto mismo sucede con las fibras de actina (figuras 22.b y 22.c) que están más repartidas por el citoplasma y no siguen una orientación preferente como en las células tumorales HeLa.

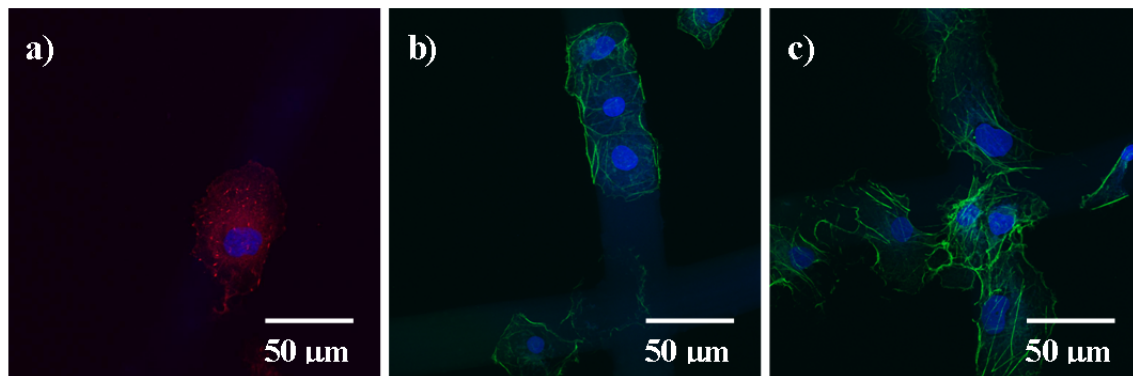


Fig. 22. Imágenes de microscopio confocal de un marcaje fluorescente de las fibras de vinculina (a) y actina (b, c) en fibroblastos COS-7 cultivados sobre estructuras poliméricas de HB14Alk 1-2.

6.3. RESUMEN

Se ha estudiado la viabilidad de la química de tiol-inos para la fabricación de biomateriales mediante fotorreticulación de macromonómeros funcionalizados con grupos alquino y reticulante con varios grupos tiol. Para ello se sintetizaron dos macromonómeros basados en un poliéster alifático hiperramificado con 16 grupos OH terminales con distinto grado de funcionalización, uno intermedio (8 grupos alquino terminales) y otro con un grado de funcionalización alto (14 grupos alquino terminales). A partir de estos macromonómeros, y utilizando distintas cantidades de agente

reticulante con grupos tiol, se prepararon películas que fueron reticuladas para obtener materiales con distinto grado de entrecruzamiento.

Se estudiaron las propiedades térmicas de los distintos materiales viéndose un aumento en la temperatura de transición vítrea (T_g) del material conforme aumenta el grado de entrecruzamiento. Se ha estudiado también la biocompatibilidad de los distintos materiales como sustrato para el crecimiento celular con células tumorales HeLa y fibroblastos COS-7. Los valores de viabilidad celular obtenidos por ensayos de MTT, próximos al 100%, muestran que todos los materiales obtenidos son biocompatibles y permiten el crecimiento celular en su superficie.

Se ha aplicado la técnica de escritura directa con láser (DLW) para la fabricación de estructuras en las que se han modificado los parámetros topográficos de las líneas que la componen (anchura y altura) con el fin de estudiar la influencia de estos parámetros en el comportamiento de las células estudiadas (células tumorales HeLa y fibroblastos COS-7) cuando son cultivadas sobre estas estructuras de geometría controlada. Estos estudios han revelado una adhesión preferente en todos los materiales estudiados, lo que hace que las células migren del vidrio hacia la estructura. Se ha comprobado que la altura influye en el proceso de migración celular desde el vidrio hasta la parte superior de la estructura polimérica, proceso que se ha observado para alturas de hasta una micra aproximadamente. La anchura por su parte se ha comprobado que influye en la morfología de las células adheridas sobre la estructura polimérica ya que las líneas con anchuras en el orden de dimensiones celulares (30-50 μm) provocan una elongación únicamente en las células tumorales HeLa. Las líneas poliméricas más estrechas, por su parte, provocan cierta elongación también en los fibroblastos COS-7 mientras que las líneas anchas no provocan este efecto en ninguna de las dos líneas

celulares estudiadas al percibir la célula esta superficie como una superficie no estructurada.

6.4. EXPERIMENTAL

6.4.1. MATERIALES

La síntesis de los macromonómeros con grupos alquino se llevó a cabo a partir de un poliéster alifático hiperramificado derivado del ácido 2,2-(dihidroximetil)propiónico que fue suministrado por Sigma Aldrich. Este poliéster, de generación 2, tiene una media de 16 grupos hidroxilo en su periferia y un peso molecular aproximado de 1750 g/mol (HB16OH), según el fabricante.

Como reticulante se utilizó el tiol multifuncional de bajo peso molecular tetrakis(3-mercaptopropionato) de pentaeritritoílo suministrado por Sigma-Aldrich.

Para los procesos de fotorreticulación se utilizó el fotoiniciador Irgacure 369 de Ciba.

Los estudios celulares se llevaron a cabo con células tumorales HeLa y con fibroblastos COS-7 como ejemplo de línea celular sana (*African Green Monkey SV40-transfected kidney fibroblasts*) tal y como se describe en el apartado 4.4.1 del capítulo 4. En este apartado se describen también los reactivos utilizados para realizar los cultivos celulares sobre los diferentes sustratos.

Para los estudios de biocompatibilidad se utilizó el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) tal y como se describe en el apartado 4.4.1 del capítulo 4.

Para el marcaje fluorescente de las fibras de actina y vinculina del citoesqueleto celular se utilizaron los anticuerpos y marcadores fluorescentes descritos en el apartado 4.4.1 del capítulo 4.

6.4.2. SÍNTESIS DE LOS MACROMONÓMEROS

Los macromonómeros con 8 grupos alquino (HB8Alk) y 14 grupos alquino (HB14Alk) fueron sintetizados por funcionalización de HB16OH con ácido 4-pentinoico mediante una esterificación de Steglich. Para ello, el HB16OH (2 g) se colocó en un matraz seco de 500 mL y se disolvió en 270 mL de THF seco. A continuación se añadieron las cantidades correspondientes de ácido 4-pentinoico (1.25 mol por cada grupo OH del polímero) y de DPTS (0.5 mol por cada grupo OH) bajo atmósfera de argón. La mezcla se enfrió en baño de hielo y se añadió gota a gota la cantidad correspondiente de DCC (1.25 mol por cada grupo hidroxilo) disuelta en 10 mL de THF seco. La mezcla de reacción se dejó agitando durante 4 días.

Tras este periodo, la dicitclohexilurea formada durante la reacción fue filtrada y el disolvente evaporado. El sólido resultante se disolvió en 100 mL de diclorometano (DCM) y se llevaron a cabo 3 extracciones con 75 mL de agua, una con 75 mL de una disolución de NaOH al 2% y una última con 75 mL de una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro y el DCM se evaporó parcialmente hasta un volumen aproximado de unos 40 mL. Por último el polímero se precipitó en 200 mL de hexano y se secó a vacío y temperatura ambiente durante 24 h.

HB8Alk Rdto: 83%

HB14Alk Rdto: 74%

HB8Alk ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ): 4.05-4.40 (m, 42H, CH_2), 3.38-3.83 (m, 34H, CH_2), 2.52-2.60 (m, 16H, CH_2), 2.43-2.52 (m, 17H, CH_2), 1.96-2.03 (m, 8H, $\text{C}_{\text{sp}}\text{-H}$), 1.13-1.30 (m, 36H, CH_3). IR (NaCl, cm^{-1}): 3270 ($\text{C}_{\text{sp}}\text{-H}$), 2113 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1735 ($\text{C}=\text{O}$), 1226, 1135, 1015 cm^{-1} (C-O). Análisis elemental: C 58.28 %, H 6.74 %, O 34.98 % (calculado para $\text{C}_{115}\text{H}_{160}\text{O}_{53}$: C 57.79 %, H 6.70 %, O 35.51 %).

HB14Alk ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ): 4.08-4.33 (m, 51H, CH_2), 3.35-3.70 (m, 18H, CH_2), 2.50-2.59 (m, 29H, CH_2), 2.42-2.49 (m, 29H, CH_2), 1.95-2.02 (m, 14H, $\text{C}_{\text{sp}}\text{-H}$), 1.15-1.28 (m, 36H, CH_3); IR (NaCl, cm^{-1}): 3282 ($\text{C}_{\text{sp}}\text{-H}$), 2115 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1736 ($\text{C}=\text{O}$), 1230, 1130, 1014 cm^{-1} (C-O); Análisis elemental: C 60.93 %, H 6.48 %, O 32.35 % (calculado para $\text{C}_{144}\text{H}_{198}\text{O}_{59}$: C 60.37 %, H 6.48 %, O 32.36 %).

6.4.3. PREPARACIÓN DE PELÍCULAS FOTORRETICULABLES

Las películas fotorreticulables fueron preparadas por *casting* (deposición-evaporación) de formulaciones que contenían el macromonómero, el reticulante multifuncional y el fotoiniciador disueltos en DCM. Para una mezcla fotorreticulable típica se preparan unos 20 mg totales de material (macromonómero y reticulante en la relación deseada) disueltos aproximadamente en 1-2 mL de DCM y se añade un 3% en peso del fotoiniciador Irgacure 369.

Las películas se prepararon sobre sustratos de vidrio, previamente tratados con ozono durante unos minutos, para los experimentos de estructuración con luz y los ensayos celulares. Para los estudios de caracterización por espectroscopia infrarroja las películas se prepararon sobre sustratos de NaCl.

6.4.4. FOTORRETICULACIÓN DE LOS MACROMONÓMEROS

Las películas fotorreticulables fueron curadas con una lámpara de luz UV (descrita en el apartado 4.4.3 del capítulo 4) para los estudios de espectroscopia IR y los ensayos de MTT. Para la generación de estructuras de geometría controlada se utilizó el montaje de DLW descrito también en el capítulo 4. En este caso, el lavado de las zonas no expuestas se llevó a cabo con una mezcla etanol / acetona 1:1, un posterior lavado con un flujo de etanol y finalmente un proceso de secado con aire comprimido.

6.4.5. ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD

Los estudios de biocompatibilidad se llevaron a cabo mediante ensayos de viabilidad celular con MTT tal y como se describe en el apartado 4.4.4 del capítulo 4.

6.4.6. ESTUDIOS DE ADHESION CELULAR

Los estudios de adhesión celular se llevaron a cabo cultivando las células (HeLa o fibroblastos COS-7) sobre patrones de geometría controlada generados por DLW, tal y como se describe en el primer párrafo del apartado 4.4.5 del capítulo 4. Los cultivos celulares se llevaron a cabo con una densidad de 5000 (HeLa) o 10000 (fibroblastos COS-7) células en 1 mL de medio. Estos cultivos fueron observados en un microscopio de contraste de fase antes de llevar a cabo el marcaje fluorescente de las células.

El marcaje fluorescente de las fibras de actina y de vinculina en estas células se llevó a cabo por el procedimiento descrito en el apartado 4.4.5 del capítulo 4. Estas

células, marcadas fluorescentemente, se visualizaron con un microscopio confocal de fluorescencia.

La observación de las células cultivadas sobre las estructuras con diferentes topografías se realizó mediante un microscopio confocal. Para ello las células, una vez cultivadas el tiempo deseado, se fijan con formaldehído de la misma forma que se hace para el marcaje fluorescente. A continuación se lavan con PBS donde pueden ser almacenadas a 4°C. Previamente a la observación en el microscopio las muestras son lavadas 3 veces con agua Mili-Q y se secan absorbiendo cuidadosamente el agua con un papel secante.

Para la monitorización de los cultivos celulares se realizaron estudios de microscopía secuencial tal y como se llevaron a cabo para los sustratos con patrones de H5 en el capítulo 4 (descritos en el apartado 4.4.6). Esta vez los cultivos se llevaron a cabo con una densidad de 20000 células tumorales HeLa en 1 mL de medio de cultivo y las imágenes fueron registradas cada 5 min por microscopía óptica utilizando objetivos de contraste de interferencia diferencial de 40 aumentos o contraste de fase de 20 aumentos.

6.4.7. TÉCNICAS

La caracterización química de los macromonómeros se llevó a cabo por ^1H -RMN utilizando los mismos equipos que los descritos en el capítulo 3 y utilizando como disolventes DMSO deuterado para el polímero precursor y CDCl_3 para los macromonómeros funcionalizados con grupos alquino.

El proceso de fotorreticulación de las diferentes formulaciones se llevó a cabo de la misma forma que en capítulos anteriores y la caracterización espectroscópica del proceso de reticulación se llevó a cabo con los mismos equipos que los descritos en el capítulo 3. Las propiedades térmicas de los materiales reticulados obtenidos se analizaron con los equipos de TGA y DSC descritos en el capítulo 5. Los estudios de foto-DSC se llevaron a cabo preparando una película sobre una cápsula de aluminio, una vez eliminado el disolvente la cápsula se coloca directamente en el horno del DSC (cápsula sin sellar). La fuente de luz utilizada fue un accesorio del fotocalorimetría de TA Instruments compuesta por una lámpara de Hg de alta presión de 200 W y 45 mW/cm² de intensidad provista de un filtro de 250-450 nm. La luz fue transmitida a la muestra a través de un guía óptica de cuarzo.

Los estudios de biocompatibilidad celular se llevaron a cabo midiendo la absorbancia a 570 nm del formazán generado en el equipo descrito en el capítulo 4.

Para los estudios de adhesión celular, el análisis de la topografía de las estructuras (con y sin células adheridas) se realizó con el microscopio confocal descrito en el capítulo 3. Por último, la monitorización *in vitro* de los cultivos se llevó a cabo por microscopía secuencial mientras que la visualización de los marcajes fluorescentes del citoesqueleto se llevó a cabo con un microscopio de fluorescencia confocal; ambos equipos fueron descritos en el apartado 4.4.6 del capítulo 4. En el caso de la microscopía secuencial se utilizaron tanto el objetivo 40x HCX PL S-APO de contraste de interferencia diferencial descrito en el capítulo 4, como un objetivo de contraste de fase 20x HCX PL FLUOTAR.

7. CONCLUSIONES

En esta tesis doctoral se ha estudiado la preparación de biomateriales microestructurados como soportes para el cultivo celular mediante dos nuevas estrategias de fotorreticulación basadas en reacción de dos grupos funcionales diferentes, alternativas a la fotopolimerización vía radicales libres de acrilatos, que es la más ampliamente utilizada en la preparación de biomateriales. De los resultados obtenidos en este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones generales:

- i) Las reacciones estudiadas, basadas en la fotodescomposición de grupos diazonio y en la química de tiol-inos respectivamente, son una alternativa apropiada a la polimerización radicalaria de acrilatos en la preparación de biomateriales útiles como soporte para el cultivo celular.
- ii) La fotodescomposición de sales de diazonio permite reticular polímeros naturales sin necesidad de modificación química, así como polímeros sintéticos, procesados en forma de películas preparadas a partir de disolución acuosa dando lugar a materiales biocompatibles.
- iii) La química de tiol-inos permite reticular de una manera rápida y eficaz polímeros modificados con grupos alquino terminales dando lugar a materiales biocompatibles.
- iv) La técnica de escritura con láser permite microestructurar películas de fotopolímeros basados en las estrategias de fotorreticulación estudiadas. Estas microestructuras permiten lograr una adhesión selectiva de las células sobre determinadas áreas del sustrato.
- v) El control de los parámetros topográficos de la microestructura mediante técnicas de estructuración con luz sobre estos materiales permite influir en procesos celulares tales como la morfología, la orientación o la migración celular.

