



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Materiales compuestos con base en matrices poliméricas biodegradables para uso en reparación y regeneración de tejido óseo**

**Luis Andrés Gaona Corral**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Mecánica y Mecatrónica

Bogotá D.C. Colombia

2013



# **Materiales compuestos con base en matrices poliméricas biodegradables para uso en reparación y regeneración de tejido óseo**

**Luis Andrés Gaona Corral**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Doctor en Ingeniería - Ciencia y Tecnología de Materiales**

Director:

Jairo Ernesto Perilla Perilla  
Ingeniero Químico, MSc, PhD  
Departamento de Ingeniería Química y Ambiental  
Universidad Nacional de Colombia - Bogotá

Co-Director:

José Luis Gómez Ribelles  
Ingeniero Industrial, PhD  
Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular  
Universidad Politécnica de Valencia - España

Co-Directora:

Myriam Madeleine Lebourg  
Ingeniera de Materiales, PhD  
Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular  
Universidad Politécnica de Valencia - España

Línea de Investigación:  
Materiales Poliméricos

Grupo de Investigación:  
Grupo de Procesos Químicos y Bioquímicos

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Mecánica y Mecatrónica  
Bogotá D.C.

2013



*A mis padres, Elvira y Evelio, quienes me han dado las herramientas y el amor para construir lo mejor que hay en mí.*

*A mi Janet, quien siempre me apoya en las buenas, y sobre todo me soporta en las malas.*

*A mi familia en ultramar: Tatiana, Carmen, Jorge, Dunia y Clara, quienes me dieron fuerza, valor y alegría, para nunca desfallecer.*

*A mis amigas: Luisa, Marisol, Luz Janneth y Jaidit, casi 18 años y seguimos ahí.*

*A Colombia, este es un pasito más para “bajar los índices de ignorancia un poquito”.*

*A España, fui por el oro pero he conseguido algo más valioso: nuevos(as) amigos(as) y renovada fe en la humanidad.*



# AGRADECIMIENTOS

Luis Andrés Gaona Corral agradece y hace reconocimiento a quienes de una u otra forma hicieron posible llevar a cabo esta tesis:

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, **COLCIENCIAS**, a través de la Convocatoria Nacional para Estudio a Nivel de Doctorado en Colombia Año 2009, BECAS “FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS”, por su apoyo financiero.

Al Proyecto *Colombia, Costa Rica, Panamá, European Network*, **COOPEN**, – Programa *Erasmus Mundus External Cooperation Window*, código: 2009-5124/001-001-ECW, quienes financiaron mi estancia de dos años (2010-2012) en la *UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA* - España.

A todos los integrantes del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular, **CBIT**, de la *UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA*, donde fueron realizados los ensayos experimentales contenidos en esta tesis y financiados dentro del proyecto MCINN-MAT2010-21611-C03-01 del Ministerio Español de Ciencia e Innovación.

A mi Codirectora **Myriam Madeleine Lebourg**, del CBIT, por su orientación del trabajo de laboratorio y análisis de resultados, además de haber realizado los cultivos sobre los materiales sintetizados.

A mi Codirector **José Luis Gómez Ribelles** del CBIT, por su orientación en el trabajo de laboratorio y análisis de resultados.

Al **Servicio de Microscopía** donde fueron realizadas las pruebas Microscopía Electrónica de Barrido; y al **Instituto de Tecnología Química**, donde se realizaron ensayos de Resonancia Magnética Nuclear; ambos pertenecientes a la *UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA*.

Al *Departament de Ciències Experimentals*, *UNIVERSITAT JAUME I*, Castellón - España, donde se realizaron los ensayos de Espectroscopía de Relajación Dieléctrica, y a **Roser Sabater i Serra** del CBIT, quien brindó asesoría en el análisis de los datos obtenidos.

A mi Director **Jairo Ernesto Perilla** del Departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA - Bogotá, por su acertada orientación y enorme paciencia.

A **Jhon Jairo Olaya** y **José Manuel Arroyo**, coordinadores del Programa del Doctorado en Ingeniería - Ciencia y Tecnología de Materiales, del Departamento de Ingeniería Mecánica y Mecatrónica de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA - Bogotá, por su colaboración.

A **Víctor Manuel Rodríguez**, Superintendente de Producción; **Alcia Soto**, Directora de Investigación y Desarrollo; y **Miguel Krausz**, Gerente; de la Compañía de Grasas y Productos Químicos, GRASCO Ltda, quienes facilitaron y permitieron alternar mis actividades académicas con el trabajo en la Planta de Producción.



# RESUMEN

## MATERIALES COMPUESTOS CON BASE EN MATRICES POLIMÉRICAS BIODEGRADABLES PARA USO EN REPARACIÓN Y REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO

Se pretende aprovechar las propiedades mecánicas y osteogénicas de la Poli ( $\epsilon$ -Caprolactona) (PCL), aumentando su degradabilidad al incorporar un agente hidrofílico como el Poli (Óxido de Etileno) (PEO), o de alta degradabilidad como el Poli (L-Ácido Láctico) (PLLA). Así, poliuretanos a partir de dioles de PCL y PEO como segmentos poliméricos, y Hexametildisocianato (HMDI) como agente enlazante, son sintetizados y caracterizados en bajo y alto peso molecular. Los poliuretanos de bajo peso molecular resultan ser altamente cristalinos y presentando dos fases amorfas independientes, pero resultan no tener capacidad de adhesión osteoblástica por el alto contenido de PEO. Para compensar la falta de osteoconductividad, los poliuretanos de alto peso molecular son también sintetizados con menor contenido de PEO, y se evalúan integrando Fibronectina (FN) en la matriz polimérica y Risedronato de Sodio (RSD) en partículas de Hidroxiapatita (HAp), obteniendo materiales compuestos que permiten la proliferación y diferenciación osteoblástica. Se evalúa además la degradación hidrolítica de membranas fabricadas previamente mediante *freeze extraction*; estas membranas son mezclas de PLLA y PCL, hallando que la relación PLLA/PCL=80/20 w/w se mantiene durante 66 semanas de degradación, a pesar de los cambios en sus propiedades mecánicas y aumento del grado de cristalinidad.

Palabras clave: Poliuretanos, Poli ( $\epsilon$ -Caprolactona), Poli (Óxido de Etileno), Osteoblastos, Risedronato de Sodio, Degradación Hidrolítica, Poli (Ácido L-Láctico).

## ABSTRACT

### COMPOSITES BASED ON BIODEGRADABLE POLYMERIC MATRIXES FOR REPAIR AND REGENERATION OF BONE TISSUE

The objective of this thesis is to take advantage of Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) (PCL) mechanical and osteogenic properties by raising its degradability. It may be achieved by integrating both Poly (Ethylene Oxide) (PEO) as hydrophilic factor, and Poly (L-Lactic Acid) (PLLA) as high degradability agent. So, polyurethanes were synthesized from diols of PCL and PEO as polymeric segments, and Hexamethylene Diisocyanate (HMDI) as bonding agent, yielding low and high molecular weight copolymers, and then characterized. Low molecular weight polyurethanes have high crystal content and show two different amorphous zones, but they have no capability of osteoblastic adhesion because of the high PEO content. In order to improve the osteoconductivity, high molecular weight polyurethanes were also synthesized and characterized using lower PEO content, and then evaluated by incorporating both Fibronectin (FN) in the polymeric matrix and Sodium Risedronate (RSD) in Hydroxyapatite (Hap) particles; indeed, these composites allow osteoblasts to proliferate and differentiate. It was also evaluated the hydrolytic degradation of membranes, which were previously made by freeze extraction technique; these membranes are blends of PLLA and PCL, and it was found that composition PLLA/PCL=80/20 *w/w* remained during 66 weeks of degradation, besides the changes of its mechanical properties and degree of crystallinity.

Key words: Polyurethanes, Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone), Poly (Ethylene Oxide), Osteoblasts, Sodium Risedronate, Hydrolytic Degradation, Poly (L-Lactic Acid).

# TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
AGRADECIMIENTOS .....	VII
RESUMEN .....	IX
TABLA DE CONTENIDO .....	XI
LISTA DE FIGURAS .....	XIII
LISTA DE TABLAS .....	XVII
INTRODUCCIÓN .....	1
OBJETIVOS .....	5
Objetivo General .....	5
Objetivos Específicos .....	5
1. PARTE I: POLIURETANOS DE PCL Y PEO .....	7
1.1 ESTADO DEL ARTE.....	7
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
1.2.1 Condiciones de Polimerización.....	9
1.2.2 Seguimiento de la polimerización. ....	11
1.2.3 Análisis por <sup>1</sup> HNMR.....	14
1.2.4 Cromatografía de Permeación en Gel (GPC).....	14
1.2.5 Absorción de agua .....	17
1.2.6 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) .....	17
1.2.7 Microscopía Óptica .....	18
1.2.8 Pruebas Mecánicas .....	18
1.2.9 Espectroscopia de Relajación Dieléctrica (DRS).....	19
1.2.10 Cultivos Celulares .....	20
1.3 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	20
1.3.1 Avance de la Reacción .....	20
1.3.2 Composición .....	24
1.3.3 Distribución de Peso Molecular .....	26
1.3.4 Fase amorfa y fase cristalina .....	29
1.3.5 Absorción de agua .....	38
1.3.6 Ensayos de Tensión .....	40
1.3.7 Análisis Dinámico Mecánico (DMA).....	43
1.3.8 Relajación Dieléctrica (DRS).....	46
1.3.9 Comportamiento Celular .....	56
2. PARTE II: POLIURETANOS DE ALTO PESO MOLECULAR Y LIBERACIÓN DE RISEDRONATO DE SODIO.....	59
2.1 ESTADO DEL ARTE.....	59
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	62
2.2.1 Condiciones y seguimiento de la Polimerización.....	62
2.2.2 Caracterización de los poliuretanos PCL/PEO-HMW.....	64
2.2.3 Adsorción de Risedronato de Sodio en Hidroxiapatita.....	64
2.2.4 Liberación de Risedronato de Sodio en PBS. ....	65

2.2.5	Concentración del Risedronato de Sodio mediante HPLC.....	66
2.2.6	Cultivos Celulares.....	68
2.3	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	69
2.3.1	Avance de la Reacción.....	69
2.3.2	Distribución de Peso Molecular .....	69
2.3.3	Fase amorfa y fase cristalina .....	71
2.3.4	Absorción de Agua .....	74
2.3.5	Propiedades Mecánicas .....	75
2.3.6	Adsorción y Liberación de Risedronato de Sodio. ....	79
2.3.7	Comportamiento celular.....	83
3.	PARTE III. CARACTERIZACIÓN DE MEMBRANAS DE PLLA Y PCL DEGRADADAS	89
3.1	ESTADO DEL ARTE .....	89
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS .....	91
3.2.1	Cromatografía líquida y Resonancia Magnética.....	91
3.2.2	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) .....	91
3.2.3	Cromatografía de Permeación en Gel (GPC) .....	92
3.2.4	Ensayos de indentación .....	93
3.2.5	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .....	94
3.3	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	94
3.3.1	Pérdida de peso.....	94
3.3.2	Medición del contenido de PLLA en las membranas .....	95
3.3.3	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) .....	99
3.3.4	Temperaturas de Fusión .....	103
3.3.5	Cristalinidad .....	105
3.3.6	Distribución del Peso Molecular .....	107
3.3.7	Propiedades Mecánicas .....	111
3.3.8	Morfología Interna.....	113
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	117
4.1	Conclusiones .....	117
4.2	Recomendaciones.....	120
A.	ANEXO: CULTIVO CELULAR (OSTEOBLASTOS) .....	123
	SUBCULTIVO DE CÉLULAS MC3T3-E1 (OSTEOBLASTOS).....	123
	CULTIVO SOBRE LOS POLIURETANOS PCL/PEO .....	124
	CULTIVO SOBRE LOS POLIURETANOS PCL/PE0-HMW .....	125
	Proliferación ( <i>Alamar Blue</i> ).....	125
	Diferenciación (ALP) .....	126
	Inmunofluorescencia .....	127
B.	ANEXO: PREPARACIÓN Y DEGRADACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE PLLA/PCL	129
	PREPARACIÓN DE MEMBRANAS POR <i>FREEZE EXTRACTION</i> .....	129
	DEGRADACIÓN EN SOLUCIÓN BUFFER PBS .....	129
	BIBLIOGRAFÍA.....	131

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1-1: Estructura química de los reactivos y el poliuretano PCL/PEO obtenido.....	9
Figura 1-2. Reacciones alternas a partir de isocianato y agua en presencia de trietileamina como catalizador (Shkapenko <i>et al.</i> 1960) .....	10
Figura 1-3. Montaje para la destilación azeotrópica previa a la síntesis de los poliuretanos PCL/PEO. 13	
Figura 1-4. Montaje para la síntesis de los poliuretanos PCL/PEO .....	14
Figura 1-5. Curva de Calibración GPC de patrones de PS en THF 0,5mL/min. ....	15
Figura 1-6. Curva de Calibración GPC de patrones de PEO en agua, 1mL/min. ....	16
Figura 1-7. Cambio de color en la titulación inversa en solución homogénea de baja viscosidad .....	21
Figura 1-8. Cambio de color en la titulación inversa en suspensión lechosa de alta viscosidad.....	22
Figura 1-9. Avance de la reacción en un volumen de 100mL para los poliuretanos PCL/PEO.....	22
Figura 1-10. Avance de la reacción en un volumen de 70mL para los poliuretanos PCL/PEO.....	23
Figura 1-11. Espectro <sup>1</sup> H NMR para el poliuretano PCL/PEO=90/10. ....	24
Figura 1-12. Composición de los poliuretanos PCL/PEO de acuerdo a los resultados de <sup>1</sup> H NMR.....	25
Figura 1-13. Relación entre las áreas de <i>f</i> y <i>g</i> en los espectros <sup>1</sup> H NMR de los poliuretanos PCL/PEO 26	
Figura 1-14. Cromatogramas de GPC de los poliuretanos PCL/PEO en THF, 0,5mL/min .....	27
Figura 1-15. Distribución de peso molecular del macrómero y poliuretano de PCL 100/0.....	28
Figura 1-16. Distribución de peso molecular del macrómero y poliuretano de PEO 0/100 .....	28
Figura 1-17. Termograma DSC, detalle de la zona de transición vítrea. Las flechas señalan la <i>T<sub>g</sub></i> de los poliuretanos PCL/PEO .....	29
Figura 1-18. Temperatura de transición vítrea, <i>T<sub>g</sub></i> , datos experimentales (————) y datos estimados mediante la Ecuación (1-13) (— — —); cambio del calor específico, $\Delta C_p$ , en la transición vítrea de los poliuretanos PCL/PEO. ....	30
Figura 1-19. Películas de poliuretanos PCL/PEO (espesor aproximado 100 $\mu$ m) bajo microscopio óptico con luz polarizada.....	31
Figura 1-20. Películas de poliuretanos PCL/PEG. Ampliación de las fotografías de la Figura 1-19.....	31
Figura 1-21. Termogramas de DSC, primer calentamiento para poliuretanos de PCL/PEO. Se identifica el pico de fusión adicional en la composición PCL/PEO=80/20.....	32
Figura 1-22. Temperatura de Fusión, <i>T<sub>m</sub></i> , de los poliuretanos PCL/PEO. $\diamond$ y $\blacklozenge$ corresponden al pico de fusión principal. $\Delta$ y $\blacktriangle$ corresponden al segundo pico de fusión de la composición PCL/PEO=80/20 ..	33
Figura 1-23. Calor de Fusión para poliuretanos PCL/PEO. La línea discontinua corresponde a una relación del calor de fusión proporcional a la composición. ....	34
Figura 1-24. Déficit del Calor de Fusión, <i>Def</i> , en los poliuretanos PCL/PEO.....	35
Figura 1-25. Termogramas de DSC, enfriamiento después de borrar la historia térmica, para poliuretanos de PCL/PEO. Se identifica el pico de fusión adicional en la composición PCL/PEO=80/20 .....	37

Figura 1–26. Termograma de DSC, segundo calentamiento, para poliuretanos de PCL/PEO. Se identifica el pico de fusión adicional en la composición PCL/PEO=80/20 .....	37
Figura 1–27. Cantidad de agua absorbida por los polímeros PCL/PEO, en peso $C_{H_2O,w}$ y en área $C_{H_2O,A}$ .....	38
Figura 1–28. Termogramas de DSC para poliuretanos PCL/PEO secos (——) y después de su hinchamiento en agua (— — —), normalizado respecto al polímero seco.....	39
Figura 1–29. Calor de fusión correspondiente a muestras de poliuretanos PCL/PEO hidratadas y secas .....	40
Figura 1–30. Curvas de Esfuerzo a partir de ensayos de tensión para los poliuretanos PCL/PEO a temperatura ambiente.....	41
Figura 1–31. Módulo Elástico, $E$ , medido a temperatura ambiente y obtenido de pruebas de tensión para poliuretanos PCL/PEO. La tendencia lineal en composiciones intermedias es asociada al tamaño de esferulita. ....	42
Figura 1–32. Módulo de Almacenamiento $E'$ para poliuretanos PCL/PEO .....	44
Figura 1–33. Factor de Pérdida, $Tan\delta$ , para poliuretanos PCL/PEO .....	45
Figura 1–34. Módulo de Disipación, $E''$ , para poliuretanos PCL/PEO .....	45
Figura 1–35. Representación de la temperatura de transición vítrea a partir de DSC, $T_{gDSC}$ , y su equivalente a partir de los datos de DMA, $T_{\alpha DMA}$ , para los poliuretanos PCL/PEO .....	46
Figura 1–36. Permittividad, $\epsilon'$ , para los poliuretanos de PCL 100/0 y de PEO 0/100 a $10^3 Hz$ . ....	48
Figura 1–37. Factor de Pérdida Dieléctrica, $\epsilon''$ , para los poliuretanos PCL 100/0 y de PEO 0/100 a $10^3 Hz$ .....	48
Figura 1–38. Factor de Pérdida Dieléctrica, $\epsilon''$ , a frecuencia constante para poliuretanos PCL/PEO ....	49
Figura 1–39. Relaxaciones $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$ para el poliuretano de PEO 0/100. Las líneas discontinuas corresponden a 4 y $10^3 Hz$ . ....	50
Figura 1–40. Ajuste al modelo de Arrhenius para las relajaciones $\gamma$ medidas por DRS para los poliuretanos PCL/PEO.....	52
Figura 1–41. Ajuste al modelo de Vogel-Fulcher-Tamman-Hesse para las relajaciones $\alpha$ de los poliuretanos PCL/PEO.....	54
Figura 1–42. Temperatura de transición vítrea a partir de DSC, $T_{gDSC}$ , su equivalente a partir de DMA, $T_{\alpha DMA}$ , y la transición vítrea dieléctrica a partir de DRS, $T_{gDRS}$ , en los poliuretanos PCL/PEO. ....	55
Figura 1–43. Temperaturas de relajación $\alpha$ experimentales ( $\blacktriangle$ ) mediante DRS y estimadas ( $\diamond$ ) mediante el modelo VFTH, para los poliuretanos PCL/PEO. ....	56
Figura 1–44. Adhesión celular sobre los poliuretanos PCL/PEO .....	57
Figura 2–1. Estructura del Risedronato de Sodio Hemipentahidratado, RSD-HPH, y el Risedronato de Sodio Anhidro, RSD-Anh.....	61
Figura 2–2. Preparación de las muestras para la liberación de RSD, a partir de una suspensión de HAp+RSD en solución de PCL/PEO-HMW en cloroformo.....	65
Figura 2–3. Cromatograma de HPLC típico del RSD.....	66
Figura 2–4. Ajuste del pico correspondiente al RSD utilizando funciones de distribución normal.....	67
Figura 2–5. Curva de Calibración de HPLC de la concentración del RSD-Anh .....	68

Figura 2–6. Avance de la reacción para poliuretanos PCL/PEO-HMW .....	69
Figura 2–7. Distribución de peso molecular de los poliuretanos de PCL 100/0 y 100/0-HMW .....	70
Figura 2–8. Distribución de peso molecular de los poliuretanos de PEO 100/0 y 0/100-HMW .....	71
Figura 2–9. Termogramas de DSC, primer calentamiento para los poliuretanos de PCL/PEO-HMW, comparados con los poliuretanos PCL/PEO.....	72
Figura 2–10. Termogramas de DSC, enfriamiento después de borrar la historia térmica, para poliuretanos PCL/PEO-HMW, comparados con poliuretanos PCL/PEO .....	72
Figura 2–11. Termograma de DSC, segundo calentamiento para poliuretanos PCL/PEO-HMW comparados con poliuretanos PCL/PEO .....	73
Figura 2–12. Cantidad de agua absorbida por los poliuretanos. Comparación entre PCL/PEO y PCL/PEO-HMW.....	75
Figura 2–13. Curvas de Esfuerzo a partir de los ensayos de tensión para los poliuretanos PCL/PEO-HMW a temperatura ambiente .....	75
Figura 2–14. Módulo de Almacenamiento, $E'$ , para poliuretanos PCL/PEO-HMW .....	76
Figura 2–15. Módulo de Disipación, $E''$ , para poliuretanos PCL/PEO-HMW.....	77
Figura 2–16. Factor de pérdida, $Tan\delta$ , para poliuretanos PCL/PEO-HMW.....	78
Figura 2–17. Factor de Pérdida, $Tan\delta$ , para el poliuretano de PEO 0/100-HMW. Se indica la distorsión entre $-30$ y $20^{\circ}C$ , asociado a una posible relajación de cadena. ....	78
Figura 2–18. Módulo de Almacenamiento, $E'$ , comparando poliuretanos de PEO 0/100 y 0/100-HMW. Se señala un segundo punto de inflexión, asociado a una posible relajación de cadena. ....	79
Figura 2–19. Concentración de RSD-Anh, [RSD], en las partículas de HAp durante el proceso de adsorción. Ajuste al modelo de pseudo-segundo orden.....	80
Figura 2–20. Concentración de RSD en la solución de PBS durante el proceso de liberación de RSD desde los poliuretanos PCL/PEO-HMW. Todas las muestras contienen RSD+HAp. ....	81
Figura 2–21. Cromatogramas HPLC de liberación de RSD desde muestras de HAp+RSD. Se evidencia la degradación del RSD en solución por el cambio de posición del pico en aproximadamente $2,1\text{min}$ ..	82
Figura 2–22. Adhesión de osteoblastos $3h$ después de la siembra sobre muestras de PCL/PEO-HMW* sin incorporación de FN. ....	83
Figura 2–23. Ensayo de <i>Alamar Blue</i> . Proliferación celular de osteoblastos sembrados sobre muestras basadas en poliuretanos PCL/PEO-HMW .....	84
Figura 2–24. Actividad de ALP normalizada de osteoblastos sembrados sobre muestras basadas en poliuretanos PCL/PEO-HMW .....	85
Figura 2–25. Inmunofluorescencia Colágeno. Osteoblastos sembrados sobre muestras basadas en poliuretanos PCL/PEO-HMW y FN. Fotografías tomadas a los 14 días después de la siembra. ....	86
Figura 2–26. Inmunofluorescencia Osteocalcina. Osteoblastos sembrados sobre muestras basadas en poliuretanos PCL/PEO-HMW y FN. Fotografías tomadas a los 14 días después de la siembra. ....	87
Figura 3–1. Reacciones de Hidrólisis en el grupo éster de la PCL y el PLLA .....	90
Figura 3–2. Curva de Calibración del GPC a partir de patrones de PS en THF, $1\text{mL}/\text{min}$ .....	93
Figura 3–3. Peso remanente durante la degradación de las membranas PLLA/PCL.....	95
Figura 3–4. Cromatograma de HPLC típico de una muestra de PLLA/PCL degradada .....	96

Figura 3–5. Curva de Calibración de la concentración del ácido l-láctico para HPLC.....	96
Figura 3–6. Espectro <sup>1</sup> H NMR para una mezcla PLLA/PCL.....	97
Figura 3–7. Contenido de PLLA obtenido mediante HPLC y <sup>1</sup> H NMR en las membranas de PLLA/PCL a las 33 semanas de degradación. ....	97
Figura 3–8. Contenido de PLLA durante la degradación de las membranas PLLA/PCL.....	98
Figura 3–9. Relación del contenido de PLLA y PCL entre 0 semanas ( $X_0$ ) y 65 semanas ( $X_{65}$ ) durante la degradación de las membranas PLLA/PCL. ....	99
Figura 3–10. Termogramas DSC. PLLA y PCL puros como pellet y membrana. Primer calentamiento. 0 semanas (————), 11 semanas (————), 33 semanas ( - - - - ), 65 semanas ( - - - - - ). ....	100
Figura 3–11. Termogramas DSC. Membranas PLLA/PCL. Primer calentamiento. 0 semanas.....	101
Figura 3–12. Termogramas DSC. PLLA y PCL puros como pellet y membrana. Segundo calentamiento. 0semanas(————), 11semanas(————), 33semanas(- - - - ), 65semanas(- - - - -). ....	102
Figura 3–13. Termogramas DSC. Membranas PLLA/PCL. Segundo calentamiento. 0 semanas .....	103
Figura 3–14. Evolución de la temperatura de fusión, $T_m$ , para el PLLA y la PCL puros como pellet y membrana durante la degradación .....	104
Figura 3–15. Evolución de la temperatura de fusión, $T_m$ , para el PLLA y la PCL en las membranas de PLLA/PCL durante la degradación.....	105
Figura 3–16. Evolución del Grado de Cristalinidad del PLLA y la PCL en las membranas de PLLA/PCL durante la degradación.....	106
Figura 3–17. Cromatogramas de GPC de las membranas PLLA/PCL en THF, 1mL/min. 0semanas ...	107
Figura 3–18. Cambio en el Peso Molecular Promedio en Peso, $M_w$ , de las membranas PLLA/PCL durante la degradación en relación con el cambio en la composición durante la degradación. ....	109
Figura 3–19. Relación entre la temperatura de fusión, $T_m$ , y la longitud de cristal calculado, $L_c$ , del PLLA calculado para las 65 semanas (◇) y 33 semanas (◆) de degradación.....	110
Figura 3–20. Evolución del módulo elástico por compresión para las membranas PLLA/PCL durante la degradación.....	111
Figura 3–21. Fotografías de SEM de la estructura interna del PLLA y la PCL, como pellet y membrana antes y después de la degradación hidrolítica. ....	113
Figura 3–22. Fotografías de SEM de la estructura interna de las membranas PLLA/PCL antes y después de la degradación hidrolítica. ....	114



## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1–1. Cantidades utilizadas de los reactivos, calculadas a partir del peso molecular promedio de los macrómeros en la síntesis de los poliuretanos PCL/PEO.....	11
Tabla 1–2 Validación del método de titulación inversa para la cuantificación del HMDI.....	20
Tabla 1–3. Contenido de HMDI en la reacción para la composición PCL/PEO=80/20 .....	22
Tabla 1–4. Avance de la reacción después de 3 horas para los poliuretanos PCL/PEO, en 70mL. .	23
Tabla 1–5. Peso molecular promedio estimado para poliuretanos de PCL 100/0 y de PEO 0/100 .	28
Tabla 1–6. Grados de cristalinidad, $X_c$ , de los poliuretanos de PCL 100/0 y de PEO 0/100.....	34
Tabla 1–7. Puntos de Fluencia y Fractura de los poliuretanos PCL/PEO a partir de las medidas de tensión a temperatura ambiente .....	41
Tabla 1–8. Valores de las constantes según el ajuste al modelo de Arrhenius en los poliuretanos PCL/PEO para las relajaciones $\gamma$ .....	53
Tabla 1–9. Valores de las constantes según el ajuste al modelo VFTH de los poliuretanos PCL/PEO para las relajaciones $\alpha$ .....	54
Tabla 2–1. Cantidades utilizadas de los reactivos, calculadas a partir de la distribución molecular de los macrómeros, en la obtención de poliuretanos PCL/PEO-HMW. ....	64
Tabla 2–2. Composición de PBS en concentración 1x para 50mL de solución. ....	66
Tabla 2–3. Peso molecular promedio para poliuretanos PCL/PEO y PCL/PEO-HMW .....	70
Tabla 2–4. Propiedades térmicas de los poliuretanos PCL/PEO-HMW comparados con los poliuretanos PCL/PEO, medidos en el primer calentamiento. ....	71
Tabla 2–5. Propiedades mecánicas de los poliuretanos PCL/PEO-HMW a partir de las medidas de tensión a temperatura ambiente .....	76
Tabla 2–6. $T_g$ medido mediante DSC y $T\alpha$ medido mediante DMA, comparando los poliuretanos PCL/PEO-HMW y PCL/PEO.....	77
Tabla 3–1: Porcentaje de peso remanente después de la degradación para PLLA y PCL puros, como pellets y membranas. ....	94
Tabla 3–2. Cambio del Índice de Polidispersidad para las membranas PLLA/PCL durante la degradación.....	108



# INTRODUCCIÓN

## *Ingeniería Tisular de hueso*

El tejido óseo puede describirse como un material compuesto que tiene una fase inorgánica de Hidroxiapatita (HAp), un fosfato cálcico que le confiere dureza, y una fase orgánica conformada principalmente de Colágeno Tipo I que le otorga elasticidad, propiedades que en conjunto permiten soportar grandes esfuerzos sin quebrarse. Además, es un tejido en constante remodelación por la acción celular, por lo que su estructura y composición están en permanente cambio según el esfuerzo que ha de soportar. Así, se espera que los implantes que se utilicen para reparar este tipo de tejido favorezcan la formación de nuevo tejido óseo u osteogénesis, empezando con la osteoconducción, que se refiere a la capacidad del implante de proveer una estructura sobre la cual las células óseas puedan migrar desde el tejido circundante. También se requiere de la osteoinducción, propiedad del implante que permite a las células osteoprogenitoras, o células madre, diferenciarse y convertirse en osteoblastos, células que producen la matriz ósea sintetizando Colágeno Tipo I que luego mineralizan depositando HAp entre sus fibras. Dentro de este contexto, los materiales poliméricos son candidatos de gran potencial en la búsqueda de implantes que cumplan los requerimientos en ingeniería tisular, ya que sus propiedades pueden ser fácilmente cambiadas durante su síntesis, mediante mezclas o modificando sus grupos funcionales. Polímeros como Poli (Ácido L-Láctico) (PLLA), Poli (Ácido Glicólico) (PGA), Poli (Etileno) (PE), etc., y de manera destacada la Poli ( $\epsilon$ -Caprolactona) (PCL), han sido utilizados para este fin.

## *La PCL en ingeniería tisular de hueso: ventajas y desventajas*

La PCL es un excelente material en ingeniería tisular que favorece el crecimiento y proliferación de células de cartílago (da Silva *et al.* 2010, Casper *et al.* 2010, Garcia-Giralt *et al.* 2008, Schagemann *et al.* 2010) y células óseas (Amato *et al.* 2007, Ciapetti *et al.* 2003), permite una fácil transformación para su estudio mediante técnicas sencillas como *solvent casting* y *spin coater*, u otras más elaboradas para obtener estructura tridimensional como *freeze extraction* (Izquierdo *et al.* 2008, Zhao *et al.* 2003) y *electrospinning* (Danesin *et al.* 2012, Pant *et al.* 2011). Las características de la PCL permiten diseñar materiales que demuestran gran resistencia a la degradación en el agresivo ambiente que los líquidos tisulares ofrecen, de 2 a 4 años (Woodruff *et al.* 2010), cambiando por ejemplo su peso molecular y/o porosidad. Pero lo que en principio parece una ventaja al presentar poca degradación, se convierte en inconveniente al momento de regenerar nuevo tejido por parte de los osteoblastos que se adhieren al implante hecho de PCL, ya que si el implante no se degrada a una velocidad equivalente a la velocidad con que el nuevo tejido se

forma, se obtiene una regeneración o curación incompleta del lugar de la lesión que se pretende regenerar.

*Estrategia propuesta en la tesis: Acelerar la degradación*

Así, estudiar alternativas para acelerar la degradación de implantes basados en PCL se convierte en un aspecto primordial, buscando aprovechar las ventajas de este polímero en cuanto a sus propiedades mecánicas y proliferación celular, pero mejorando su velocidad de degradación para permitir una adecuada regeneración de tejido óseo. Para esto, el correspondiente trabajo experimental fue realizado en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la Universidad Politécnica de Valencia - España, donde se utilizaron técnicas de caracterización como DSC, GPC,  $^1\text{H}$  NMR, DMA y DRS, en el análisis de los polímeros estudiados. Así, esta Tesis se ha dividido en tres partes que describen igual número de materiales basados en PCL.

*Parte I.* A partir del diol de la PCL y del Poli (Óxido de Etileno) (PEO), en presencia de hexametildisocianato (HMDI) se obtienen los poliuretanos PCL/PEO. En este caso, el aumento de la degradabilidad habrá de obtenerse por el aumento en la hidrofiliidad que proporciona el PEO; sin embargo, esta parte se limita tanto al estudio de la caracterización de los poliuretanos PCL/PEO, copolímeros que se comportan como un copolímero de bloque al azar y cuyos segmentos de PCL y PEO son capaces de cristalizar en todo el intervalo de composiciones estudiados, siendo el grado de cristalinidad la propiedad que rige sus propiedades mecánicas. La presencia de PEO incrementa la hidrofiliidad del copolímero, lo que trae como consecuencia una mayor capacidad de degradación; sin embargo, 10%*mol* de PEO en el copolímero evidencia una total falta de adherencia de células osteoblásticas sobre la matriz polimérica, por lo que se hace necesario buscar una composición que satisfaga los requerimientos de degradación, manteniendo sus propiedades osteoconductoras. Los cultivos de osteoblastos sobre los poliuretanos PCL/PEO fueron realizados por Myriam Lebourg, Codirectora de esta Tesis.

*Parte II.* Teniendo en cuenta la información resultante de la caracterización de los poliuretanos PCL/PEO, se sintetizan nuevos copolímeros modificando las proporciones de PCL, PEO y HMDI, denominados poliuretanos PCL/PEO-HMW, caracterizados por un mayor peso molecular, menor grado de cristalinidad y menor contenido de PEO, siendo capaces de absorber mayor contenido de agua, pero con limitadas propiedades osteoconductoras. Por tanto, a la matriz polimérica le fue incorporada fibronectina, tratamiento que proporcionó evidentes mejoras en la adherencia celular

hasta 10%*mol* de PEO. Se aprovecha además la modulación de la hidrofiliicidad para estudiar la liberación un fármaco antiosotoporótico, el Risedronato de Sodio (RSD), parte de la familia de los bisfosfonatos; el RSD es previamente adsorbido en partículas de HAp, para luego ser incorporadas en la matriz polimérica. La liberación controlada del RSD desde estos materiales compuestos, mejora la proliferación y diferenciación de los osteoblastos sembrados. De igual manera, los cultivos de osteoblastos sobre los poliuretanos PCL/PEO-HMW fueron realizados por Myriam Lebourg, Codirectora de esta Tesis.

*Parte III.* Se describe la caracterización de mezclas porosas de PLLA y PCL degradadas previamente en solución buffer fosfato PBS por Myriam Lebourg, Codirectora de esta Tesis; en este caso el PLLA no posee naturaleza hidrofílica, pero si tiene una degradabilidad superior a la correspondiente de la PCL, lo que aumenta la velocidad de degradación de la matriz polimérica. Se observa durante el proceso de degradación hidrolítica, que el peso y el peso molecular de las membranas se reducen a mayor contenido de PLLA, pero aumentando su resistencia mecánica en las primeras semanas de degradación debido a un proceso de cristalización del PLLA. Un contenido de 20%*w* de PCL aumenta la resistencia del PLLA a ser degradado e inclusive mejora sus propiedades mecánicas.

Parte de los resultados presentados en la presente tesis han sido publicados según:

Eventos:

- The Effect of Degradation on PLLA/PCL Membranes Prepared by Freeze Extraction. European Polymer Congress. Granada-Spain, 26th June - 1st July, 2011
- Síntesis y Caracterización de Poliuretanos con base en PCL y PEG. XIII Simposio Latinoamericano de Polímeros. Bogotá-Colombia, 23-26 Septiembre 2012.

Revistas:

- Hydrolytic Degradation of PLLA and PCL Microporous Membranes Prepared by Freeze Extraction. 2012. Polymer Degradation and Stability, 97, 1621-1632



# OBJETIVOS

## Objetivo General

Estudiar las propiedades de materiales poliméricos con base en PCL, mezclado con PLLA en membranas porosas, y obtenido en forma de poliuretano junto con PEO, llevando a cabo su respectiva caracterización, con el fin de evaluar su potencial como matriz polimérica en materiales del tipo Fase Polimérica - Fase Inorgánica, evaluando su aplicación para regeneración ósea en técnicas de ingeniería tisular o como implantes ortopédicos.

## Objetivos Específicos

- Analizar y entender el comportamiento físico químico de las mezclas PLLA/PCL y los poliuretanos PCL<sub>co</sub>PEO, tomando como parámetros de evaluación las propiedades mecánicas, cristalinidad y biodegradabilidad.
- Definir las condiciones necesarias para la obtención de poliuretanos a partir de PCLdiol y macrómeros de PEO buscando que el polímero elaborado sea propicio para el crecimiento celular
- Estudiar el comportamiento de los copolímeros PCL<sub>co</sub>PEO obtenidos, evaluando el papel que juega la incorporación de Hidroxiapatita, así como el efecto de la liberación de Risedronato de Sodio en el crecimiento celular.
- Estudiar el cambio en las propiedades mecánicas y cristalinas de las membranas porosas hechas a partir de mezclas de PLLA/PCL durante y después de su degradación hidrolítica en solución buffer fosfato.
- Realizar recomendaciones sobre los métodos de diseño de matrices poliméricas con fines ortopédicos a partir de los datos y conclusiones obtenidos.





# 1. PARTE I: POLIURETANOS DE PCL Y PEO

Se describe a continuación la obtención y caracterización de poliuretanos basados en segmentos de PCL ( $\bar{M}_n \approx 2000$ ), PEO ( $\bar{M}_n \approx 4000$ ) y HMDI. Es ampliamente utilizado el término Poli (Éster Éter Uretano), para describir este tipo de copolímeros. Sin embargo, los copolímeros aquí estudiados son referidos como “poliuretanos PCL/PEO”, cuya composición es presentada como PCL/PEO *mol/mol*. El poliuretano compuesto solamente de segmentos de PCL se denomina “poliuretano de PCL 100/0”; y el poliuretano cuyos segmentos son de PEO se denomina “poliuretano de PEO 0/100”.

Las denominaciones Poli (Etilén Glicol) (PEG) y PEO, son empleados por varios autores para nombrar cadenas poliméricas cuya unidad repetitiva es  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ . Sin embargo, la denominación PEG se aplica solo a pequeñas cadenas, cuya naturaleza química tiene significativas contribuciones por parte de los grupos  $-\text{OH}$  terminales en cada cadena, dado su bajo peso molecular (Spitzer *et al.* 2002). En cambio, PEO es referido a cadenas de alto peso molecular, en las que los grupos  $-\text{OH}$  terminales no aportan significativamente a las propiedades finales de la cadena; por tanto esta última denominación será utilizada en la presente investigación.

## 1.1 ESTADO DEL ARTE

Los poliuretanos biodegradables han sido ampliamente estudiados con el fin de aprovechar sus propiedades dentro de la ingeniería tisular. Estos polímeros ofrecen varias ventajas en el diseño de materiales biodegradables: buena biocompatibilidad, fácil funcionalización para el crecimiento y la proliferación celular, y una velocidad de degradación modulable. Además, sus propiedades mecánicas pueden ser modificadas para su uso en tejidos duros o blandos (Vermette *et al.* 2001, Bonzani *et al.* 2007).

Poliuretanos anfifílicos, es decir con características hidrofóbicas e hidrofílicas, han sido sintetizados buscando aprovechar las propiedades mecánicas de la PCL como el componente hidrofóbico, y las propiedades del PEO como el elemento hidrofílico; estos materiales, dada su

biocompatibilidad y no toxicidad, son ideales en los proceso de liberación de fármacos y en la fabricación de implantes con velocidad de degradación variable, de acuerdo al contenido del componente hidrofílico.

Se han estudiado poliuretanos con segmentos de PEO y PCL en diferentes distribuciones: a) multibloque del tipo PEO-PCL-PEO (Yen 1997, Petrova *et al.* 2008); b) poliuretanos dibloque PCL-PEO de bajo peso molecular e inyectable (Sosnik *et al.* 2003) y c) en bloque al azar (Cometa 2010), siendo este último tipo de distribución de particular interés en el presente estudio.

Una de las características que se busca en los poliuretanos PCL/PEO, como polímeros de interés para ser materiales implantables, es la capacidad de permitir la proliferación celular sobre su superficie, capacidad que se reduce con la presencia del PEO (Hubbell 2007). Para fomentar esta proliferación, varios procedimientos han sido utilizados: incorporación de microdominios de PCL dispersos dentro del poliuretano, con lo que se logra la adherencia de osteoblastos (Wingkono *et al.* 2008); como una simple alternativa, el contenido de PEO en el poliuretano se mantiene en bajos valores, consiguiendo así la adhesión de fibroblastos (Rechichi *et al.* 2008); también se ha funcionalizado el poliuretano con la incorporación de proteínas dentro de la estructura de la cadena polimérica y sobre su superficie, logrando la adhesión de células endoteliales (Guan *et al.* 2005).

Es particularmente interesante el trabajo realizado por Cometa y colaboradores (Cometa 2010, Cometa *et al.* 2010), quienes han centrado su investigación en poliuretanos con segmentos de PCL ( $\bar{M}_n \approx 2000$ ) y PEO ( $\bar{M}_n \approx 2000$ ) distribuidos como bloques al azar, comprobando su degradabilidad hidrolítica y enzimática, sin características citotóxicas y una adhesión exitosa por parte de fibroblastos hasta el 25% *w* de PEO.

Como características generales de los trabajos previos acerca de los poliuretanos PCL/PEO, las longitudes del segmento de la PCL y el PEO son mantenidas en el mismo orden de magnitud, con pesos moleculares entre 500 y 2.000. Además, se suele limitar la composición en que el contenido de PCL es mayoritario, dejando de lado la caracterización de aquellas composiciones en que el PEO se encuentra en mayor proporción.

Por tanto, el presente estudio precisa una descripción más completa de las propiedades de los poliuretanos PCL/PEO en un intervalo más amplio de composiciones incluyendo el poliuretano

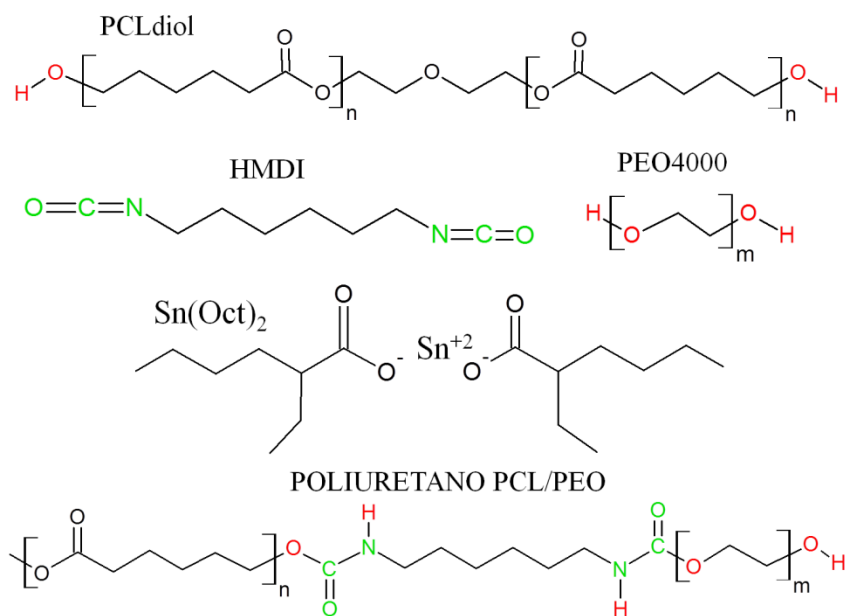
compuesto únicamente de segmentos de PEO; también cabe utilizar segmentos de PEO con peso molecular mayor que el correspondiente a la PCL, y evaluando también la capacidad de adhesión de los osteoblastos sobre la matriz polimérica, prueba clave en el éxito de los poliuretanos PCL/PEO en la reparación y regeneración de tejido óseo.

## 1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.2.1 Condiciones de Polimerización

Se utilizaron HMDI de pureza 99% (Sigma), Tolueno (Scharlab), Octoato de estaño ( $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ) (Sigma) y los prepolímeros de PEO (Sigma,  $\bar{M}_n \approx 4000$ ) (PEO4000) y Policaprolactonadiol (Sigma,  $\bar{M}_n \approx 2000$ ) (PCLdiol). Las estructuras de estos reactivos y el poliuretano obtenido pueden ser vistos en la Figura 1-1.

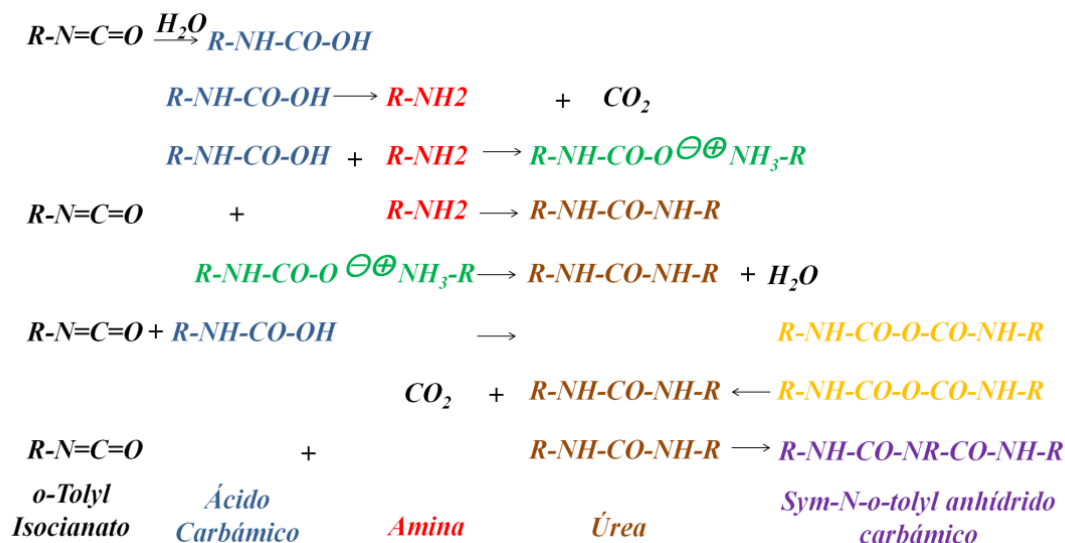
**Figura 1-1: Estructura química de los reactivos y el poliuretano PCL/PEO obtenido**



Las condiciones de polimerización se ajustan según datos aportados por varios autores (Cometa 2010, Chan-Park *et al.* 2004, Nagata 2006, Jiang *et al.* 2007) y reacciones previas llevadas a cabo. La polimerización en solución favorece la remoción de calor de la mezcla reactiva, debido al carácter exotérmico de la mayoría de las polimerizaciones, además de permitir una cómoda extracción del producto terminado del balón de reacción. El uso de un solvente permite asimismo

eliminar la posible humedad de los reactivos mediante destilación azeotrópica, ya que la presencia de agua produciría un gran número de reacciones laterales que consumen los grupos isocianato, reduciendo la eficiencia de la polimerización, según la Figura 1–2.

**Figura 1–2. Reacciones alternas a partir de isocianato y agua en presencia de trietilamina como catalizador (Shkapenko *et al.* 1960)**



Las cantidades utilizadas, tomando una masa,  $m_T$ , que incluye los macrómeros y el HMDI, se calculan asumiendo que los macrómeros son monodispersos, según las Ecuaciones (1–1), que al ser combinadas, permiten hallar las cantidades de cada macrómero y del HMDI en función de  $Y_{PCL}$  y  $m_T$ , obteniendo las Ecuaciones (1–2).

$$\text{Balance molar:} \quad \frac{m_{PCL}}{\bar{M}_{PCL}} + \frac{m_{PEO}}{\bar{M}_{PEO}} = \frac{m_{HMDI}}{M_{HMDI}}$$

$$\text{Balance en masa:} \quad m_{PCL} + m_{PEO} + m_{HMDI} = m_T \quad (1-1)$$

$$\text{Fracción en masa:} \quad Y_{PCL} = \frac{m_{PCL}}{m_{PCL} + m_{PEO}}$$

Donde:

$m_{PCL}$ ,  $m_{PEO}$ , y  $m_{HMDI}$ , son la masa de PCLdiol, PEO4000 y HMDI respectivamente.

$\bar{M}_{PCL}$  = 2000 es el peso molecular promedio del PCLdiol

$\bar{M}_{PEG}$  = 4000 es el peso molecular promedio del PEO4000

$Y_{PCL}$  es la fracción en peso de PCL, libre de isocianato en el copolímero

$M_{HMDI}$  = 168 es el peso molecular del HMDI

$$\begin{aligned}
 m_{PCL} &= \frac{Y_{PCL} \cdot m_T}{M_{HMDI} \cdot \left[ \frac{1 - Y_{PCL}}{\bar{M}_{PEO}} + \frac{Y_{PCL}}{\bar{M}_{PCL}} \right] + 1} \\
 m_{PEO} &= \frac{(1 - Y_{PCL}) \cdot m_T}{M_{HMDI} \cdot \left[ \frac{1 - Y_{PCL}}{\bar{M}_{PEO}} + \frac{Y_{PCL}}{\bar{M}_{PCL}} \right] + 1} \\
 m_{HMDI} &= \frac{M_{HMDI} \cdot \left[ \frac{1 - Y_{PCL}}{\bar{M}_{PEO}} + \frac{Y_{PCL}}{\bar{M}_{PCL}} \right] \cdot m_T}{M_{HMDI} \cdot \left[ \frac{1 - Y_{PCL}}{\bar{M}_{PEO}} + \frac{Y_{PCL}}{\bar{M}_{PCL}} \right] + 1}
 \end{aligned} \tag{1-2}$$

Así, para obtener  $m_T=13g$  de copolímero y una fracción,  $Y_{PCL}$ , se hallan las cantidades necesarias para la polimerización según la Tabla 1-1. El solvente utilizado para preparar la mezcla reactiva es el tolueno, en volúmenes de 70 y 100mL buscando el mayor avance de la reacción

**Tabla 1-1. Cantidades utilizadas de los reactivos, calculadas a partir del peso molecular promedio de los macrómeros en la síntesis de los poliuretanos PCL/PEO.**

<b>PCL/PEO (mol/mol)</b>	<b>PCL (%w)</b>	<b>m<sub>HMDI</sub> (g)</b>	<b>m<sub>PCL</sub> (g)</b>	<b>m<sub>PEO</sub> (g)</b>
100/0	100,0	1,008	11,992	0,000
90/10	81,8	1,004	11,876	0,120
80/20	66,7	0,851	8,099	4,050
70/30	53,8	0,790	6,575	5,635
60/40	42,9	0,737	5,256	7,008
50/50	33,3	0,690	4,103	8,207
40/60	25,0	0,649	3,088	9,263
20/80	11,1	0,580	1,380	11,040
0/100	0,00	0,525	0,000	12,475

### 1.2.2 Seguimiento de la polimerización.

En el seguimiento del avance de la polimerización, se utilizó un método adaptado a partir de la norma ASTM D5155-01 (ASTM International 2001) para cuantificar la cantidad de HMDI presente en la solución. Para ello, inmediatamente después de ser tomada de la mezcla reactiva, cada muestra de aproximadamente 1mL, se mezcla y pesa junto con 2mL de una solución de dibutilamina, DBA, 2N en tolueno. A continuación se adicionan 4mL de Isopropanol, IPA, y 1mL del indicador Azul de Bromofenol que imprime coloración azul; la mezcla se titula con HCl 0,04N

hasta el punto final de color amarillo. El fundamento de este método se basa en la reacción de los grupos isocianato del HMDI con la amina del DBA; los grupos amina del DBA todavía disponibles (en el momento de su mezcla con la muestra) se hacen reaccionar con HCl en la titulación inversa, con lo cual puede conocerse la concentración de HMDI, según la Ecuación (1-3):

$$\%HMDI = \frac{\left[ 2mL_{DBA} \cdot DBA \left[ \frac{meq}{mL} \right] - V_{HCl} [mL] \cdot HCl \left[ \frac{meq}{mL} \right] \right] \cdot \frac{168mg_{HMDI}}{2meq}}{m_{muestra} [mg]} \cdot 100 \quad (1-3)$$

Donde:

$\%HMDI$ :	Concentración en peso de HMDI.
$DBA [meq/mL]$	Concentración de la solución de DBA.
$V_{HCl} [mL]$	Volumen gastado de HCl
$HCl [meq/mL]$	Concentración de la solución de HCl.
$m_{muestra} [mg]$	Masa de la muestra
$168mg/meq$	Peso molecular de HMDI, que corresponde a 2 miliequivalentes.

La concentración de la solución de DBA se determina previamente utilizando el mismo método, titulando 2mL de DBA únicamente, según la Ecuación (1-4):

$$DBA \left[ \frac{meq}{mL} \right] = \frac{V_{HCl} [mL] \cdot HCl \left[ \frac{meq}{mL} \right]}{2mL_{DBA}} \quad (1-4)$$

Entonces el avance de la reacción  $AR_i$  para cada tiempo  $i$  se calcula según la Ecuación (1-5):

$$AR_i = \frac{\%HMDI_0 - \%HMDI_i}{\%HMDI_0} \cdot 100 \quad (1-5)$$

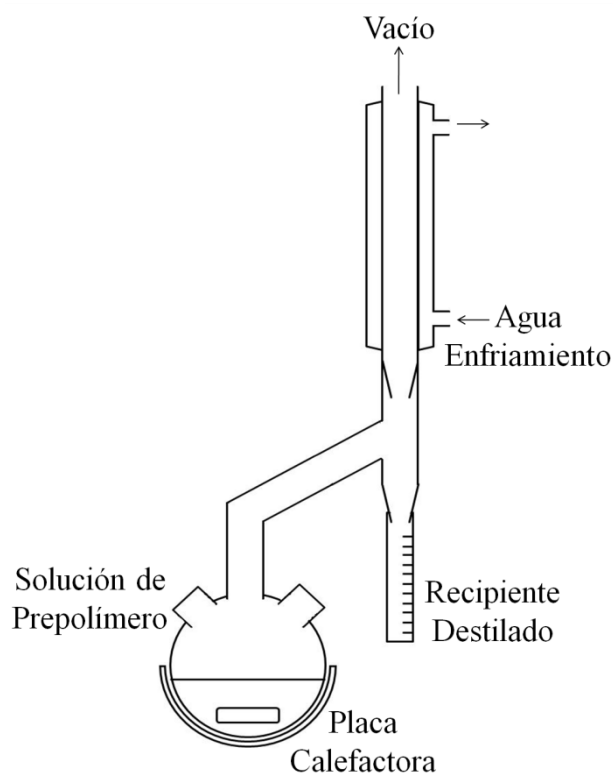
Donde

$\%HMDI_0$  y  $\%HMDI_i$  son las concentraciones de HMDI en los tiempos 0 e  $i$  de la reacción.

Así, el procedimiento definido para producir los poliuretanos PCL/PEO es: se dispone del prepolímero (PCLdiol + PEO4000) y se disuelve en un volumen,  $V$ , de tolueno. Se realiza una destilación azeotrópica al vacío a 60°C hasta recoger 12mL de destilado para eliminar posibles rastros de humedad según el montaje de la Figura 1-3. Se cambia el montaje al que muestra la

Figura 1–4 y se adiciona una cantidad estequiométrica de HMDI disuelto en 7mL de tolueno; con burbujeo de nitrógeno y agitación constantes se eleva la temperatura hasta 70°C momento en el cual se adiciona el catalizador Sn(Oct)<sub>2</sub> (durante 5 segundos aproximadamente) disuelto en 5mL de tolueno; el inicio de la reacción se asume en el instante en que termina la adición de este catalizador. Las muestras son tomadas antes del inicio de la reacción y en tiempos de polimerización previamente definidos para medir el avance de la reacción según se explicó anteriormente.

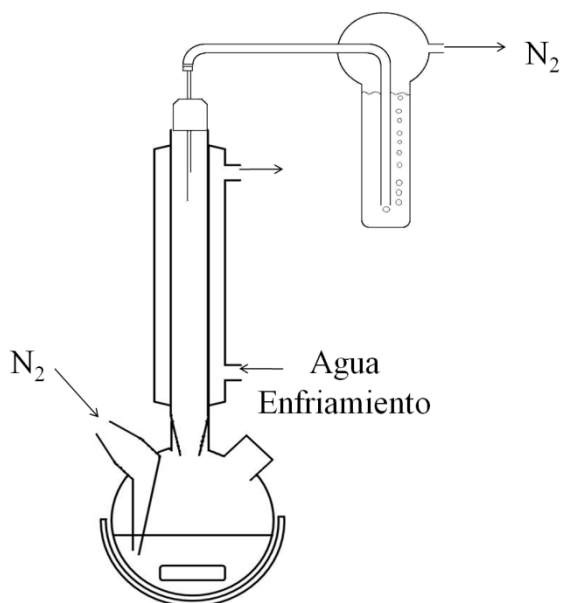
**Figura 1–3. Montaje para la destilación azeotrópica previa a la síntesis de los poliuretanos PCL/PEO.**



Transcurridas 3h de reacción se procede a enfriar el sistema y la solución se transvasa a un vaso de precipitados de 500mL. Para el poliuretano 100/0 se adicionan entre 300 y 400mL de etanol entre -5 y 0°C con permanente agitación; para los demás poliuretanos PCL/PEO se adicionan entre 300 y 400mL de dietil éter también entre -5 y 0°C y agitación, con lo que el poliuretano se insolubiliza y precipita. El líquido sobrante se descarta y el polímero se deja bajo campana de extracción en recipientes de teflón durante 48h, y a continuación durante 72h en extracción continua en desecador al vacío a temperatura ambiente para eliminar cualquier traza de los solventes utilizados. Los poliuretanos se almacenan en recipientes con desecante hasta ser utilizados en su caracterización y estudio.

Para las técnicas de Absorción de agua, DSC, Tensión, DMA y Microscopía Óptica, se fabricaron láminas de estos poliuretanos disolviéndolos en cloroformo en concentraciones que variaron entre el 5 y el 8% *w/v*, vertiendo las soluciones en moldes de teflón, permitiendo la evaporación del solvente. Las láminas obtenidas fueron cortadas en las geometrías y dimensiones requeridas por cada técnica de caracterización.

**Figura 1–4. Montaje para la síntesis de los poliuretanos PCL/PEO**



### 1.2.3 Análisis por $^1\text{H}$ NMR.

Las composiciones de los copolímeros obtenidos fueron analizadas mediante Resonancia Magnética Nuclear de Protón ( $^1\text{H}$  NMR), para lo cual se utilizó un espectrómetro Bruker AV300 a 300MHz. Tetrametilsilano (TMS) fue usado como referencia y las muestras disueltas en cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) en concentración de 10mg/mL. Los espectros fueron procesados mediante el programa MestReC 4.8.6.0

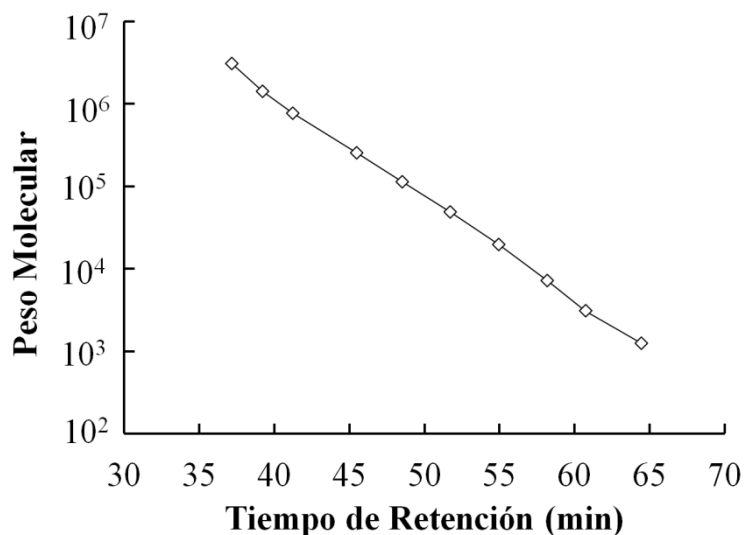
### 1.2.4 Cromatografía de Permeación en Gel (GPC)

La distribución del peso molecular de los poliuretanos PCL/PEO y los macrómeros utilizados como reactivos fue estudiada mediante GPC utilizando un cromatógrafo Waters 1525 adecuado con una bomba binaria HPLC, un detector de índice de refracción Waters 2414 y cuatro columnas



en serie Styragel HR 5 THF, Styragel HR 4 THF, Styragel HR 1 THF, Styragel HR 0.5 THF de  $7.8 \times 300 \text{ mm}$ , y tetrahidrofurano, THF, como fase móvil a un flujo de  $0,5 \text{ mL/min}$  y cloroformo para disolver las muestras al  $1\% \text{ w/v}$  ( $10 \text{ mg}$  en  $1 \text{ mL}$ ). Para estimar el peso molecular del poliuretano de PCL 100/0 y del macrómero PCLdiol se utilizaron estándares de poliestireno (PS) SM-105 (Showa Denko), con su respectiva curva de calibración según se aprecia en la Figura 1-5, y aplicando el concepto de calibración universal según lo descrito por (Painter *et al.* 1997); los parámetros de Mark-Houwink-Sakurada para el PS son  $K_{PS} = 1.14 \times 10^{-4} \text{ dL/g}$  y  $a_{PS} = 0.716$ , y los parámetros para la PCL son  $K_{PCL} = 1.395 \times 10^{-4} \text{ dL/g}$  y  $a_{PCL} = 0.786$  (Reijenga *et al.* 2007), según la Ecuación (1-6). Aunque la PCL difiere del poliuretano de PCL 100/0 debido a la existencia de los segmentos duros de HMDI, la estimación del peso molecular utilizando las constantes para la PCL puede considerarse una aproximación adecuada.

**Figura 1-5. Curva de Calibración GPC de patrones de PS en THF  $0,5 \text{ mL/min}$ .**



$$K_{PS} \cdot M_{PSi}^{a_{PS}+1} = K_{PCL} \cdot M_{PCLi}^{a_{PCL}+1} \quad (1-6)$$

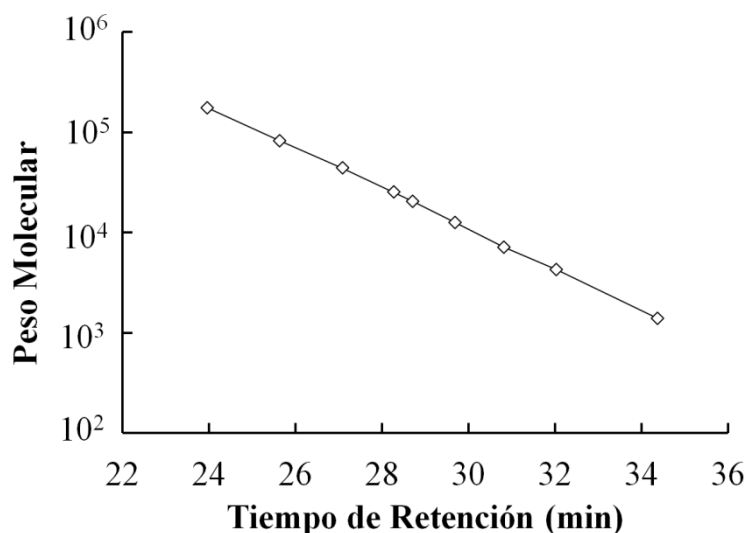
Donde

$M_{PCLi}$  y  $M_{PSi}$  son los pesos moleculares de PCL y PS respectivamente en el tiempo de retención  $i$ .

El poliuretano de PEO 0/100 y el macrómero PEO4000 fueron analizados mediante GPC en THF como solvente, bajo las mismas condiciones que el resto de composiciones para ser comparados en función del tiempo de retención; además, con el objeto de estimar la respectiva distribución de peso molecular, el poliuretano de PEO 0/100 y el macrómero PEO4000 también fueron inyectados en fase acuosa comparándolos con estándares monodispersos de PEO (Polymer Standard Service

GmbH), utilizando los mismos cromatógrafo y detector, utilizando como fase móvil agua con azida de sodio al 0,5% con un flujo de  $1\text{mL}/\text{min}$  y una concentración de muestra de  $1\text{mg}/\text{mL}$  también en solución acuosa de azida, usando 4 columnas en serie de  $7.8 \times 300\text{mm}$  Ultrahydrogel 1000, Ultrahydrogel 500, Ultrahydrogel 250 y Ultrahydrogel 120. La curva de calibración para el PEO se muestra en la Figura 1–6. De manera similar a lo analizado para el poliuretano de PCL 100/0, el poliuretano de PEO 0/100 posee segmentos duros de HMDI a diferencia de los patrones de PEO, sin embargo este método también resulta adecuado en la estimación de la distribución del peso molecular.

Figura 1–6. Curva de Calibración GPC de patrones de PEO en agua,  $1\text{mL}/\text{min}$ .



A partir de las distribuciones de peso molecular obtenidas, el Peso Molecular Promedio en Peso,  $\bar{M}_w$ , y el Peso Molecular Promedio en Número,  $\bar{M}_n$ , fueron calculados, así como el Índice de Polidispersidad,  $\text{PDI} = \bar{M}_w / \bar{M}_n$ , según las Ecuaciones (1-7):

$$\bar{M}_n = \frac{1}{\sum \frac{x_i}{M_i}} \quad \bar{M}_w = \sum x_i \cdot M_i \quad (1-7)$$

Donde

$x_i$  es la fracción de la cadena  $i$ , de peso molecular  $M_i$  presente en el polímero.

## 1.2.5 Absorción de agua

Muestras de  $10 \times 10 \text{ mm}$ , y espesor aproximado de  $0,2 \text{ mm}$ , fueron sumergidas en agua y la ganancia en peso fue medida mediante gravimetría,  $C_{H_2O,w}$ , así como el aumento del área midiendo la longitud del lado del cuadrado,  $C_{H_2O,A}$ , de acuerdo a las Ecuaciones (1–8).

$$C_{H_2O,w} = \frac{m_{Hid} - m_{Pol}}{m_{Pol}} \cdot 100 \quad C_{H_2O,A} = \frac{A_{Hid} - A_{Pol}}{A_{Pol}} \cdot 100 \quad (1-8)$$

Donde

$m_{Hid}$  y  $A_{Hid}$  son el peso y el área de la muestra hidratada.

$m_{Pol}$  y  $A_{Pol}$  son el peso y el área de la muestra sin hidratar.

Muestras hinchadas durante  $12 \text{ h}$ , lo suficientemente pequeñas para poder ser ubicadas dentro de una cápsula de aluminio de  $50 \mu\text{L}$ , también fueron cortadas para estudiar el efecto de la hidratación en la cristalinidad de los poliuretanos PCL/PEO mediante DSC, como se describe en la siguiente sección.

## 1.2.6 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Las medidas de DSC fueron llevadas a cabo en un Calorímetro Mettler Toledo 823e. Las muestras se pesaron entre  $5$  y  $10 \text{ mg}$ , a partir de láminas hechas con un procedimiento análogo a la sección 1.2.5. El calentamiento inicial se realizó a  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  desde  $-80^\circ\text{C}$  hasta  $90^\circ\text{C}$ , lo que permite el estudio de los poliuretanos después de la evaporación del solvente. Se mantuvo a  $90^\circ\text{C}$  durante 3 minutos y se enfrió hasta  $0^\circ\text{C}$  a  $2^\circ\text{C}/\text{min}$ . Entonces se llevó a cabo un segundo calentamiento a  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  hasta  $90^\circ\text{C}$  para estudiar el comportamiento después de haber borrado la historia térmica. La temperatura de transición vítrea,  $T_g$ , es hallada como el punto medio del aumento del cambio del calor específico,  $\Delta C_p$ , mientras que la temperatura de fusión,  $T_m$ , es medida en el máximo del pico de fusión.

Los grados de cristalinidad,  $X_{C,PCL}$  y  $X_{C,PEO}$ , fueron calculados utilizando los valores del calor de fusión para los cristales puros,  $\Delta H^\circ_{PCL}=136,1 \text{ J/g}$  (Yam *et al.* 1999) y  $\Delta H^\circ_{PEO}=200 \text{ J/g}$  (Beaumont *et al.* 1966, Afifi-Effat *et al.* 1972, Preechatiwong *et al.* 1996), según las Ecuaciones (1–9):

$$X_{C,PCL} = \frac{\Delta H_{PCL}}{\Delta H^{\circ}_{PCL}} \cdot 100 \quad X_{C,PEO} = \frac{\Delta H_{PEG}}{\Delta H^{\circ}_{PEG}} \cdot 100 \quad (1-9)$$

Donde

$\Delta H_{PCL}$  y  $\Delta H_{PEO}$  son los calores de fusión calculados a partir área bajo la curva de los picos de fusión de la PCL y el PEO respectivamente.

Las muestras hidratadas según se describe en la sección 1.2.5, se sometieron a un único calentamiento en un equipo DSC Pyris (Perkins-Elmer) desde 10 hasta 70°C a 5°C/min.

### 1.2.7 Microscopía Óptica

Con el objeto de verificar el comportamiento cristalino de los poliuretanos PCL/PEO, se preparan soluciones de cada composición al 1% *w/v* en cloroformo. A continuación, sobre un cubreobjeto de 12mm se adicionan 80μL de la solución y se deja evaporar a temperatura ambiente. Después la capa polimérica es observada bajo el microscopio óptico NIKKON ECLIPSE E6000, en el modo de transmisión utilizando luz polarizada y filtro NCB11, y tomando las respectivas fotografías con cámara de video acoplada al microscopio.

### 1.2.8 Pruebas Mecánicas

Para las pruebas mecánicas, se fabricaron y analizaron 5 muestras de 3x25mm y espesor aproximado de 0,15mm. Para estudiar el módulo elástico de los poliuretanos sintetizados, se sometieron las muestras a pruebas de tensión en una máquina de tracción Microtest EM1/FR y un programa de control SCM-300095, aplicando una velocidad de estiramiento de 0,5mm/min desde una longitud inicial de 15mm, a temperatura ambiente. El módulo elástico fue medido entre 1 y 2% de elongación.

Las pruebas de Análisis Dinámico Mecánico, DMA, fueron llevadas a cabo en un equipo Seiko DMS 210U, calentando desde -80 hasta 40°C a 1°C/min, aplicando una frecuencia de 1Hz, utilizando también muestras de 3x25mm y una longitud entre mordazas de 15mm. Así, fue medido el módulo complejo o dinámico,  $E^*$ , que relaciona el Módulo de Almacenamiento,  $E'$ , el Módulo de Disipación,  $E''$ , y el Factor de Pérdida o Tangente de Delta,  $Tan\delta$ , según las Ecuaciones (1-10):

$$E^* = E' + i \cdot E'' \quad Tan\delta = \frac{E''}{E'} \quad (1-10)$$

### 1.2.9 Espectroscopia de Relajación Dieléctrica (DRS)

Como alternativa a la técnica DMA, que está limitada a bajas frecuencias (hasta decenas de  $Hz$ ) y por tanto provee información solamente de procesos relativamente lentos, los poliuretanos fueron estudiados utilizando espectroscopía de relajación dieléctrica, DRS (*Dielectric Relaxation Spectroscopy*), técnica similar al DMA en la cual un campo eléctrico alterno es aplicado a la muestra, obteniendo la permitividad compleja  $\varepsilon^*$  a partir de las medidas de fase y amplitud de la corriente y el voltaje. Igual que el DMA, es posible considerar información variando la temperatura y la frecuencia entre  $10^{-2}$  y  $10^{11} Hz$  (Davis 2004)

En la técnica DRS, la muestra actúa como un dieléctrico al ser ubicada dentro de un condensador; las cargas dentro del material tienden a aproximarse al electrodo de carga opuesta, induciendo una carga adicional dentro de las placas del condensador desde la fuente de voltaje. Por tanto, la presencia del dieléctrico incrementa la capacidad del condensador de almacenar cargas. La relación entre las capacitancias con y sin dieléctrico es denominada constante dieléctrica o permitividad  $\varepsilon'$ , que en realidad no es constante pues depende de la temperatura y frecuencia. Cuando un voltaje que varía sinusoidalmente es aplicado al condensador que contiene el material dieléctrico, la carga sinusoidal resultante retrasa el voltaje en un ángulo de fase,  $\delta$  (Avakian *et al.* 2002). De ahí surge la Permitividad Dieléctrica Compleja,  $\varepsilon^*$ , la Constante Dieléctrica o Permitividad,  $\varepsilon'$ , el Factor de Pérdida Dieléctrica,  $\varepsilon''$ , y la Tangente de Pérdida Dieléctrica,  $Tan\delta$ , que se relacionan según las Ecuaciones (1–11):

$$\varepsilon^* = \varepsilon' - i \cdot \varepsilon'' \quad Tan\delta = \frac{\varepsilon''}{\varepsilon'} \quad (1-11)$$

Estas medidas se realizaron en función de la frecuencia ( $10^{-1}$  -  $10^7 Hz$ ) desde  $-140^\circ C$  hasta  $30^\circ C$  y cada  $5^\circ C$ ; fueron llevadas a cabo en un espectrómetro dieléctrico de banda ancha, consistente de un analizador de impedancia Alpha S y un control de temperatura por chorro de nitrógeno Quatro Cryosystem (Novocontrol GmbH). Se utilizaron muestras de  $15 \times 15 mm$  y espesor medio de  $0,15 mm$ . Dada la alta rugosidad en las muestras con alto contenido de PEO, producida por el gran tamaño de esferulitas que el PEO forma (evaluada por inspección visual), se hizo necesario el recubrimiento de estas muestras con oro mediante *sputtering* (recubrimiento mediante diferencia de potencial en vacío), para garantizar un contacto óptimo con los electrodos del espectrómetro. La muestra se ubica entre dos electrodos de oro ( $20 mm$  de diámetro) en un condensador de placas

paralelas, que a su vez está en un criostato BDS 1100 y expuesto a una corriente de nitrógeno gaseoso proveniente de un Dewar de nitrógeno líquido.

### 1.2.10 Cultivos Celulares

Para evaluar el comportamiento celular, se utilizan poliuretanos PCL/PEO=100/0, PCL/PEO=90/10 y PCL/PEO=80/20, composiciones que presentan el menor hinchamiento en agua por su menor contenido de PEO. Las muestras fueron preparadas a partir de soluciones de los poliuretanos PCL/PEO al 5% w/v (50mg de PCL/PEO en 1mL de cloroformo), adicionando entre 50 y 80 $\mu$ L sobre moldes circulares de teflón entre 8 y 10mm de diámetro y posterior evaporación del solvente; una vez el solvente se ha evaporado (en condiciones ambientales) se someten al vacío durante 2h para asegurar la evaporación total del cloroformo. A continuación, las láminas formadas son separadas del molde de teflón y almacenadas en recipientes con desecante, hasta ser utilizadas en el respectivo cultivo. La preparación de los medios de cultivo y la siembra de los osteoblastos sobre las muestras se describen en el Anexo A

## 1.3 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 1.3.1 Avance de la Reacción

El método de titulación inversa fue validado mediante la cuantificación de dos muestras de HMDI de masa conocida, utilizando una solución de DBA 2,0317N y una solución de HCl 0,04N cuyos resultados se aprecian en la Tabla 1-2.

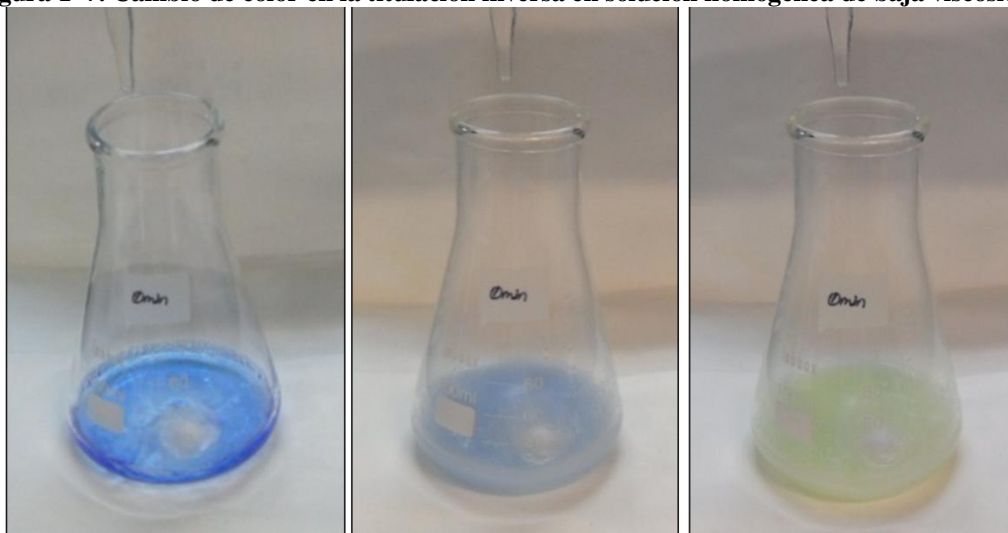
**Tabla 1-2 Validación del método de titulación inversa para la cuantificación del HMDI**

Muestra HMDI (mg)	Volumen DBA (mL)	Volumen HCl (mL)	HMDI calculado (mg)	Error %
18,62	0,4	14,7	18,89	-1,4
28,87	0,4	12,0	27,97	3,1

De acuerdo a este resultado, el método puede considerarse adecuado en la cuantificación del HMDI. Sin embargo, al momento de ser aplicado durante la polimerización, varios aspectos afectan su reproducibilidad. Cada vez que una muestra era tomada el reactor debía ser destapado,

acción que permite al solvente escapar dado el constante burbujeo de nitrógeno; la cuantificación de las muestras se realizó mediante gravimetría, que para líquidos resulta inconveniente dada la volatilidad del tolueno, pero de todos modos una mejor opción que la medición por volumetría, pues las muestras de alta viscosidad se adherían a las paredes de la pipeta, haciendo imposible la medición del volumen tomado; la preparación de la solución al titular con IPA y Azul de Bromofenol implicó transvasar la muestra del vial a un vaso Erlenmeyer de 100mL, acción que podría causar pérdida de parte de la muestra; dada la naturaleza anfifílica de los poliuretanos PCL/PEO, al iniciar el goteo de la solución de HCl, la solución a titular se convirtió en una suspensión lechosa y en algunos casos altamente viscosa, lo que dificultaba enormemente tanto su homogenización como la visualización del punto final de azul a amarillo, como puede observarse al comparar la Figura 1–7 con la Figura 1–8, en las que se aprecian las titulaciones en solución homogénea de baja viscosidad, y suspensión lechosa de alta viscosidad respectivamente.

**Figura 1–7. Cambio de color en la titulación inversa en solución homogénea de baja viscosidad**



Así, buscando cuantificar el error en el cálculo del avance de la reacción mediante el método de titulación inversa, se tomaron y cuantificaron 3 muestras antes de iniciar y otras 3 muestras a las 3 horas de reacción, esto en la polimerización de la composición PCL/PEO=80/20 en 70mL. En la Tabla 1–3 pueden verse las concentraciones de HMDI antes y después de esta reacción, con lo que se obtiene a las 3 horas un avance de  $93\pm 6\%$ , lo que todavía puede considerarse como una reproducibilidad adecuada, a pesar de las múltiples causas de error ya descritas.

Figura 1–8. Cambio de color en la titulación inversa en suspensión lechosa de alta viscosidad

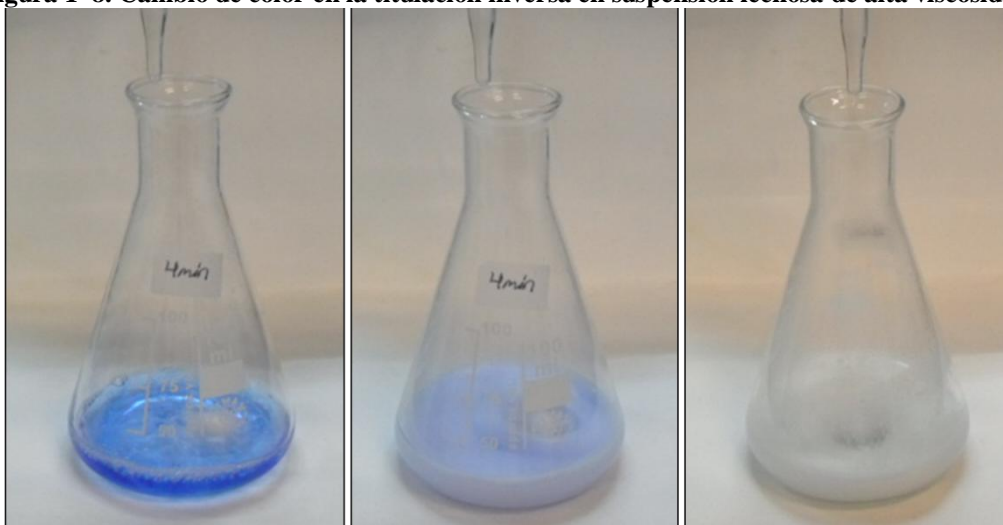


Tabla 1–3. Contenido de HMDI en la reacción para la composición PCL/PEO=80/20

Tiempo (min)	Concentración de HMDI (%w)			Promedio (%w)	Desviación Estándar
0	1,28	1,27	1,44	1,33	0,09
180	0,02	0,17	0,08	0,09	0,08

Con el fin de comparar los rendimientos de la polimerización, el avance de la reacción obtenido por el método de titulación inversa se representa en la Figura 1–9 y en la Figura 1–10, para volúmenes de 70 y 100mL respectivamente.

Figura 1–9. Avance de la reacción en un volumen de 100mL para los poliuretanos PCL/PEO.

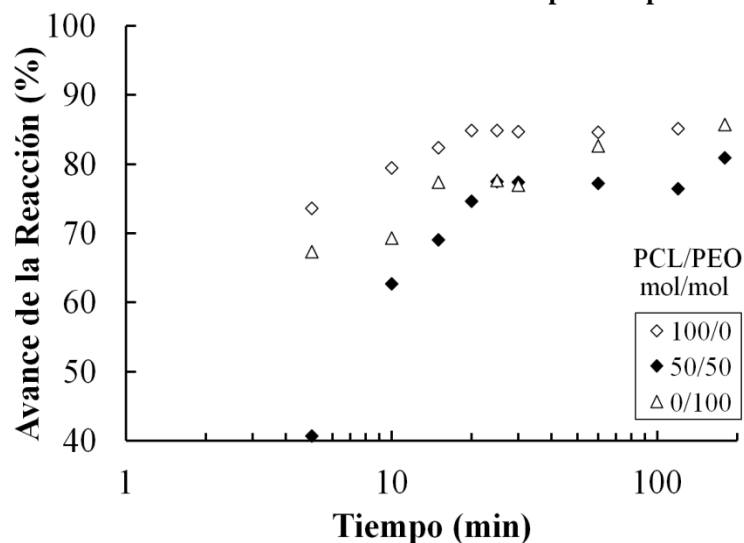
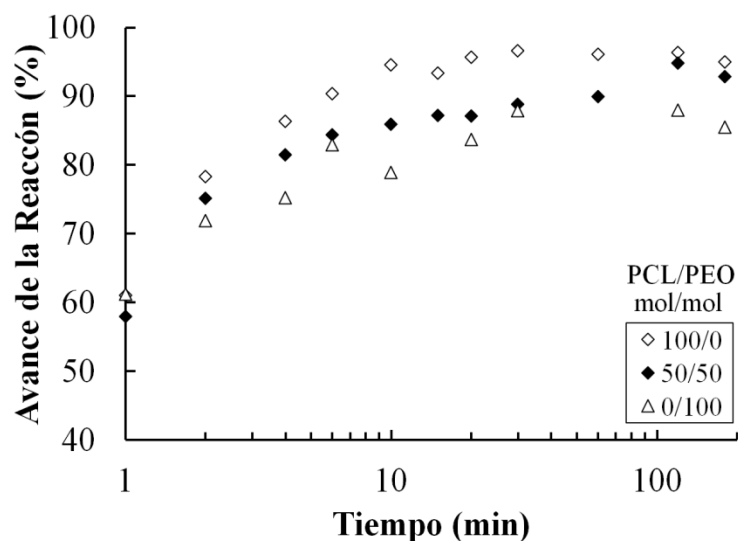




Figura 1–10. Avance de la reacción en un volumen de 70mL para los poliuretanos PCL/PEO.



El avance de la reacción fue favorecido con mayor concentración y menor peso molecular de los macrómeros, lo que permite un mayor encuentro entre grupos terminales -OH de los macrómeros y el -N=C=O del HMDI para formar los enlaces uretano. Esto se verifica a baja concentración, en que cerca de los 30 minutos se ha alcanzado el equilibrio, mientras que a alta concentración a los 10 minutos el equilibrio ya se ha alcanzado. También se verifica en el desarrollo de la reacción en la que se pudo apreciar, por inspección visual, que se obtenía mayor viscosidad de la mezcla reactiva a mayor concentración del PEO4000, macrómero de mayor peso molecular.

Dado que se obtiene un mayor avance de reacción utilizando un volumen de 70mL de tolueno, el resto de poliuretanos fueron sintetizados en estas mismas condiciones. Las reacciones de polimerización a partir de soluciones 18,6% w/v obtuvieron un avance de reacción cercano al 95% como puede apreciarse en la Tabla 1–4. Sin embargo el avance final de la composición PCL/PEO=0/100 alcanzó solamente un 85%, situación que puede atribuirse a una mayor viscosidad de la mezcla reactiva, lo que dificulta la movilidad de las cadenas y por tanto el encuentro de los grupos -OH y -N=C=O.

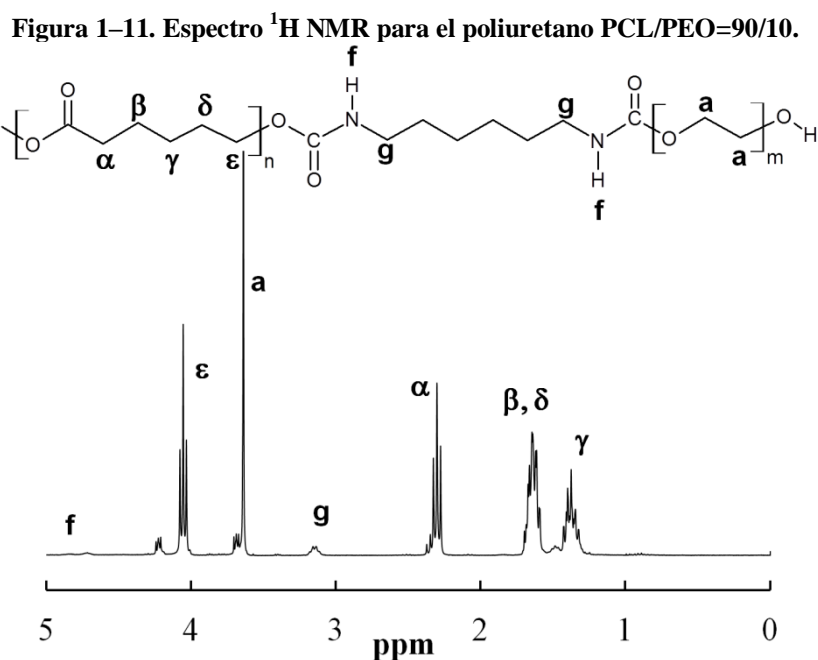
Tabla 1–4. Avance de la reacción después de 3 horas para los poliuretanos PCL/PEO, en 70mL.

PCL/PEO (mol/mol)	100/0	90/10	80/20	60/40	50/50	40/60	20/80	0/100
Avance de la Reacción (%)	95	109	93	97	93	94	104	85

Las composiciones PCL/PEO=90/10 y PCL/PEO=20/80 presentan avances de reacción superiores al 100%, lo que no necesariamente indica una total conversión de los grupos isocianato en enlaces uretano, considerando las causas de error en la cuantificación del HMDI, ya descritas.

### 1.3.2 Composición

La estructura de los poliuretanos PCL/PEO se asocia con copolímeros en bloque, en la que bloques de PCL ( $\bar{M}_n \approx 2000$ ) y bloques de PEO ( $\bar{M}_n \approx 4000$ ) se distribuyen al azar a lo largo de la cadena de copolímero, unidos entre sí por los grupos uretano. Los diferentes picos reportados en los espectros de  $^1\text{H NMR}$  fueron comparados en la literatura (Petrova *et al.* 2008, Chausson 2008, Fu *et al.* 2011) para verificar sus posiciones y calcular la composición después de la polimerización mediante la relación entre áreas. La identificación de la PCL se puede apreciar en los picos correspondientes a los protones enlazados con los carbonos nombrados como  $\varepsilon$  (4,06ppm),  $\alpha$  (2,31ppm),  $\beta$ - $\delta$  (1,64ppm) y  $\gamma$  (1,38ppm). El pico en 3,64ppm corresponde a los protones enlazados con los carbonos identificados como **a**, asociados al PEO. Los protones enlazados con los carbonos **g** se asocian al HMDI (3,15ppm) y el grupo uretano se verifica con los picos del protón **f** enlazado con el nitrógeno (4,90 y 4,70ppm). Estos picos pueden ser identificados en la Figura 1–11 correspondiente a la composición PCL/PEO=90/10, siendo un espectrograma típico de los poliuretanos PCL/PEO.



El análisis de los datos de  $^1\text{H}$  NMR se basa en la relación de las áreas entre los picos característicos de los macrómeros. Así, se normalizan los espectrogramas asignando un valor de 1 al área del pico  $\varepsilon$  en todas las composiciones, excepto para el poliuretano de PEO 0/100, donde  $\varepsilon$  no está presente y en cuyo caso el valor unitario se asigna al pico  $a$ . La relación PCL/PEO ( $w/w$ ) se halla según la Ecuación (1-12):

$$\frac{PCL}{PEG} = \frac{A_{\varepsilon} \cdot \left( \frac{114g_{PCL}}{2H^+} \right)}{A_a \cdot \left( \frac{44g_{PEO}}{4H^+} \right)} \quad (1-12)$$

Donde

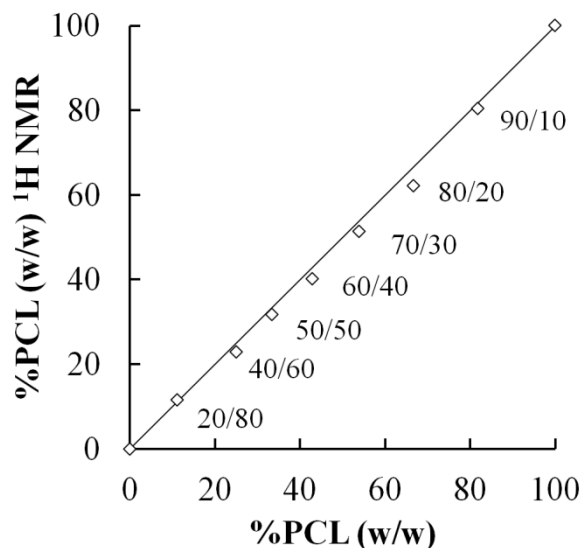
$A_{\varepsilon}$  Área del pico  $\varepsilon$ , que se lee en 4.06ppm correspondiente a  $2H^+$

$A_a$  Área del pico  $a$ , que se lee en 3.64ppm correspondiente a  $4H^+$

114g y 44g son los pesos moleculares de las unidades repetitivas del PCL y PEO respectivamente.

A partir de las relaciones PCL/PEO  $w/w$  obtenidas mediante  $^1\text{H}$  NMR, se hallan las composiciones para cada copolímero y a su vez comparadas con la composición esperada a partir de los macrómeros pesados para cada reacción; la Figura 1-12 muestra esta comparación, donde cabría esperar que los puntos experimentales estén sobre la diagonal, pero para la mayoría de composiciones se aprecia en cambio que el contenido de la PCL después de la reacción es inferior al medido antes de esta.

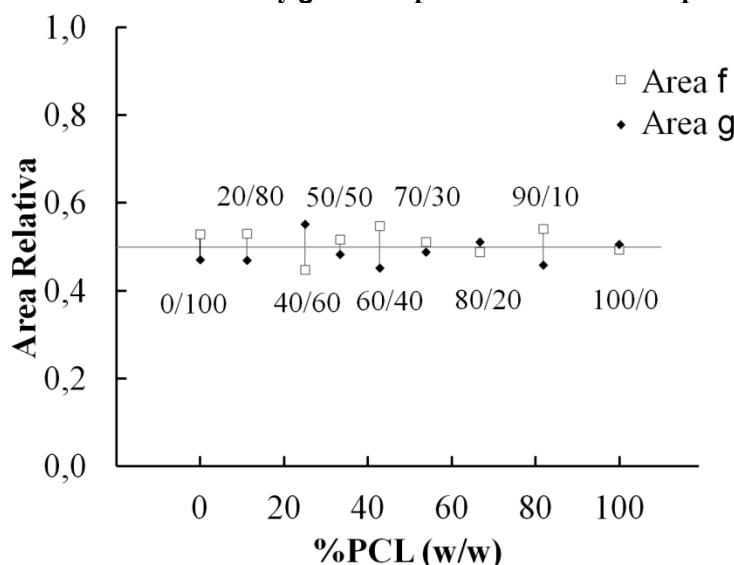
**Figura 1-12. Composición de los poliuretanos PCL/PEO de acuerdo a los resultados de  $^1\text{H}$  NMR**



Aunque esta diferencia parecer no ser significativa, el hecho que la solución sobrenadante después de la precipitación presentara aspecto lechoso, indica algún grado de pérdida de macrómeros u oligómeros; además, en varias composiciones el avance de la reacción no alcanzó el 100%. Así, podría afirmarse que parte de la PCL y de bajo peso molecular, fue disuelta por el dietil éter utilizado en el proceso de precipitación; así como parte del PEO, pero el mayor peso molecular del macrómero PEO4000 habría reducido su pérdida.

Para comprobar la presencia del enlace uretano se compara el área correspondiente a los protones *g* (equivalente a  $4H^+$  por molécula de HMDI) con el área correspondiente a los protones *f* (equivalente a  $2H^+$  por molécula de HMDI), es decir que el área de *g* ha de dividirse entre dos antes de ser comparada con el área de *f*. Se asigna un valor de 1 a la suma de ambas áreas relativas, por tanto cada área debería tener un valor de 0,5. Los valores de estas áreas pueden apreciarse en la Figura 1–13 y estos en promedio tienen una variación de  $\pm 6\%$  respecto al valor medio esperado 0,5. Este resultado verifica la formación de los enlaces uretano.

**Figura 1–13. Relación entre las áreas de *f* y *g* en los espectros  $^1H$  NMR de los poliuretanos PCL/PEO**

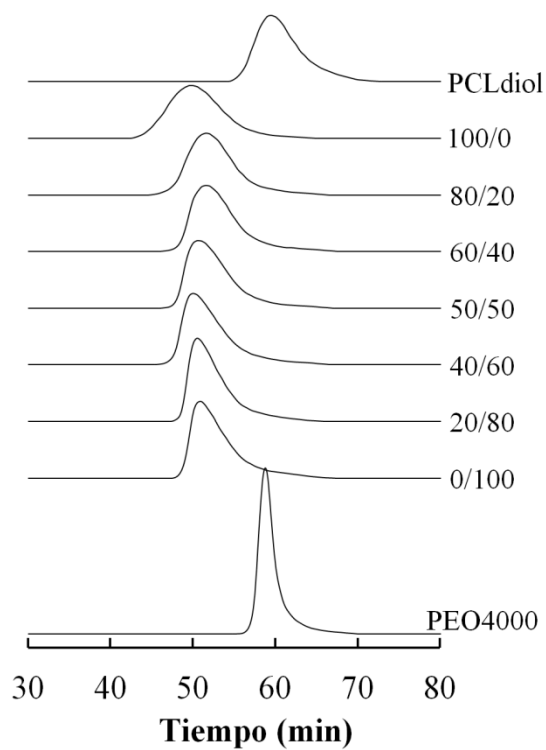


### 1.3.3 Distribución de Peso Molecular

El aumento del peso molecular después de la reacción se representa en la Figura 1–14, que es asociado con la disminución del tiempo de retención en los cromatogramas GPC de los poliuretanos obtenidos respecto a los macrómeros. Existe una fracción de cadenas de bajo peso

molecular correspondiente a los macrómeros, y por tanto presentes en el producto final, hecho que se aprecia con mayor facilidad en las distribuciones de peso molecular estimadas para los poliuretanos de PCL 100/0 y de PEO 0/100 según las Figura 1-15 y la Figura 1-16 respectivamente, e igual situación para los demás poliuretanos obtenidos, lo que produce un mayor índice de polidispersidad respecto a los macrómeros, acorde con la Tabla 1-5.

**Figura 1-14. Cromatogramas de GPC de los poliuretanos PCL/PEO en THF, 0,5mL/min**



Además, es posible inferir a partir de las distribuciones de peso molecular de los poliuretanos de PCL 100/0 y de PEO 0/100, que se han obtenido copolímeros con un índice de polidispersidad promedio cercano a 2 y de peso molecular promedio en peso,  $\bar{M}_w$ , entre  $4 \times 10^4$  y  $6 \times 10^4$ , siendo mayor con un alto contenido de PCL. El menor aumento en peso molecular, correspondiente al poliuretano de PEO 0/100, es acorde con el menor avance de reacción para esta composición.

Figura 1–15. Distribución de peso molecular del macrómero y poliuretano de PCL 100/0

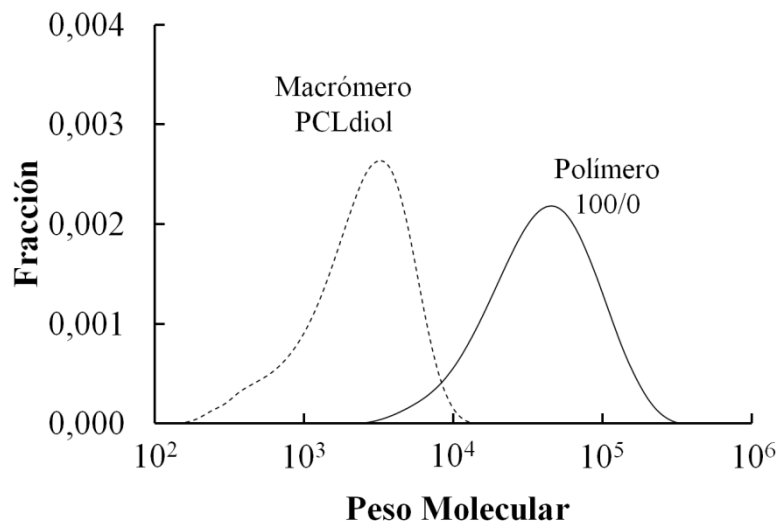


Figura 1–16. Distribución de peso molecular del macrómero y poliuretano de PEO 0/100

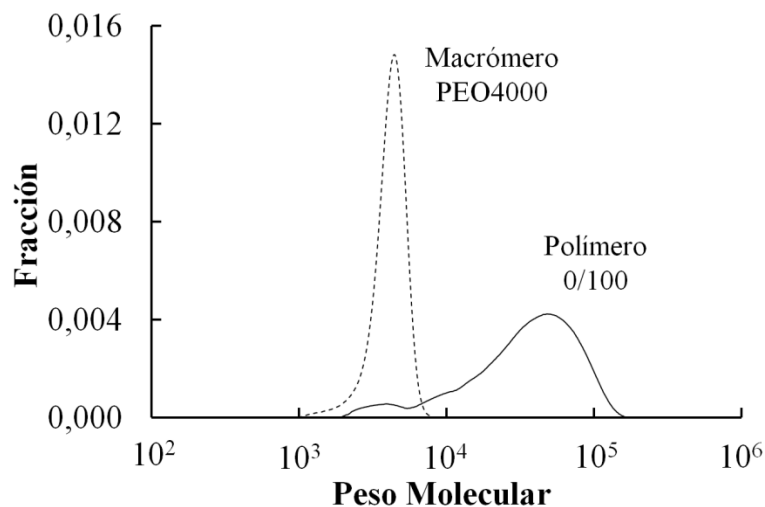


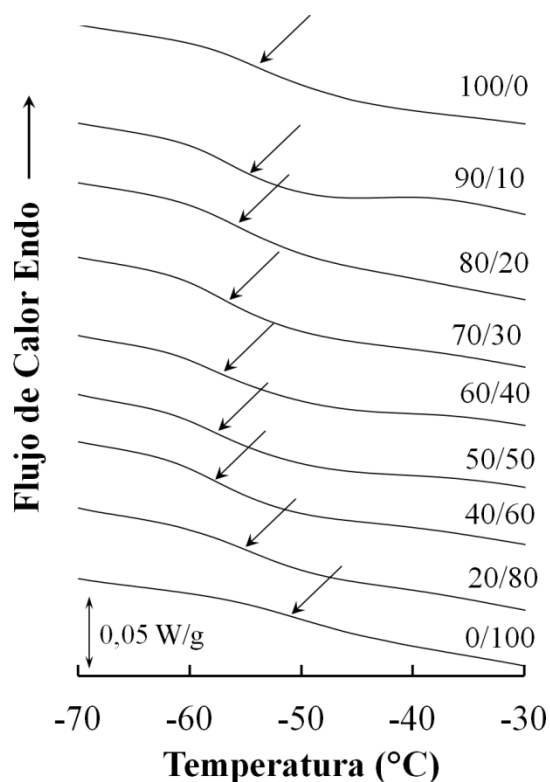
Tabla 1–5. Peso molecular promedio estimado para poliuretanos de PCL 100/0 y de PEO 0/100

Macrómero o Polímero	$\bar{M}_w$	$\bar{M}_n$	Índice de Polidispersidad
PCLdiol	2.947	1.621	1,8
100/0	59.344	26.953	1,9
PEO4000	4.217	3.925	1,1
0/100	42.966	19.915	2,2

### 1.3.4 Fase amorfa y fase cristalina

Los poliuretanos PCL/PEO son semicristalinos, como lo son los polímeros de PCL y PEO. Así, las temperaturas de transición vítrea,  $T_g$ , reportadas para PCL y PEO varían entre  $-70$  y  $-40^\circ\text{C}$  (Mark 1999). Con el objeto de estudiar la transición vítrea, se amplían los termogramas de primer calentamiento con lo que se obtienen las curvas representadas en la Figura 1–17. Se identifican las temperaturas de transición vítrea señaladas con una flecha y representadas en la Figura 1–18 (línea continua) junto con el cambio del calor específico,  $\Delta C_p$ .

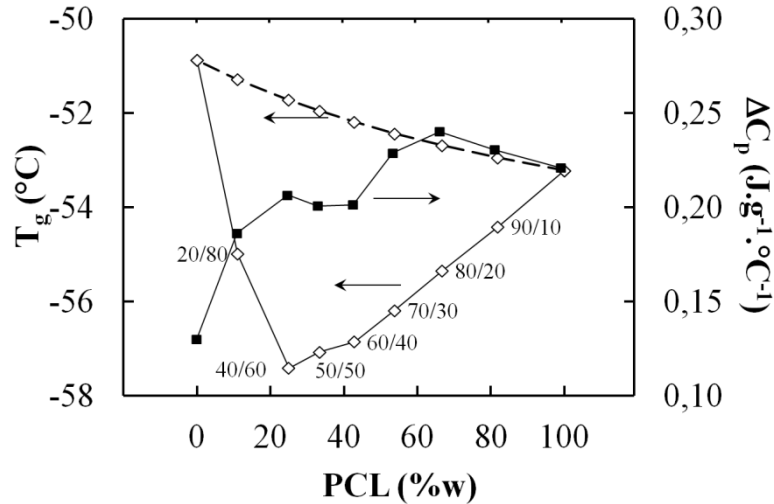
**Figura 1–17. Termograma DSC, detalle de la zona de transición vítrea. Las flechas señalan la  $T_g$  de los poliuretanos PCL/PEO**



El comportamiento de  $T_g$  al aumentar el contenido de la PCL, presenta un valor máximo en el poliuretano de PEO 0/100, disminuye hasta alcanzar un mínimo en PCL/PEO=40/60, y luego aumenta hasta el poliuretano de PCL 100/0. También puede observarse que el  $\Delta C_p$  va en aumento a mayor contenido de PCL, alcanzando un máximo en la composición PCL/PEO=80/20. Se han descrito modelos (Sperling 2005) en los cuales la temperatura de transición vítrea,  $T_g$ , de una mezcla homogénea de dos polímeros puede ser estimada, según la Ecuación (1–13). Aplicando este

modelo, se obtiene una  $T_g$  para los poliuretanos PCL/PEO y representada en la línea punteada en la Figura 1–18, muy diferente a los resultados experimentales, indicio claro de la naturaleza heterogénea de la fase amorfa de los poliuretanos PCL/PEO.

**Figura 1–18. Temperatura de transición vítrea,  $T_g$ , datos experimentales (—) y datos estimados mediante la Ecuación (1–13) (---); cambio del calor específico,  $\Delta C_p$ , en la transición vítrea de los poliuretanos PCL/PEO.**



$$\ln T_g = \frac{Y_{PCL} \cdot \Delta C_{p,PCL} \cdot \ln T_{gPCL} + Y_{PEO} \cdot \Delta C_{p,PEO} \cdot \ln T_{gPEO}}{Y_{PCL} \cdot \Delta C_{p,PEO} + Y_{PEO} \cdot \Delta C_{p,PCL}} \quad (1-13)$$

Donde:

$Y_{PCL}$  y  $Y_{PEO}$  son las fracciones en masa de la PCL y el PEO en los poliuretanos PCL/PEO.

$\Delta C_{p,PCL}$  y  $\Delta C_{p,PEO}$  son los cambios de calor específico para los poliuretanos de PCL 100/0 y PEO 0/100 respectivamente.

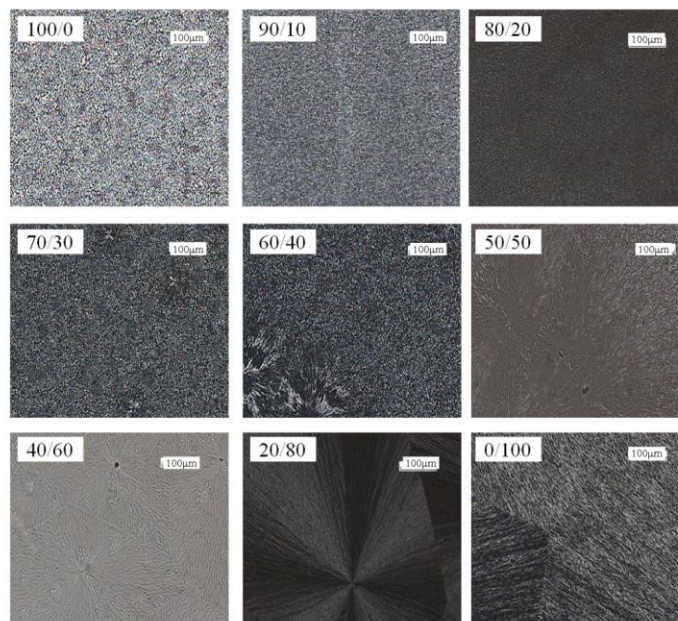
$T_{gPCL}$  y  $T_{gPEO}$  son las temperaturas de transición vítrea de los poliuretanos de PCL 100/0 y PEO 0/100 respectivamente.

La fase cristalina de los poliuretanos PCL/PEO es evidente en las fotografías de microscopía óptica de la Figura 1–19 y su ampliación en la Figura 1–20. Se observa un alto contenido de cristales, cuyo tamaño aproximado es de  $5\mu m$  en el poliuretano de PCL 100/0, hasta alcanzar el menor tamaño en PCL/PEO=80/20. En las composiciones PCL/PEO=70/30 y PCL/PEO=60/40 se ven algunos cristales de mayor tamaño (entre 20 y  $50\mu m$ ); y en las composiciones PCL/PEO=50/50 y PCL/PEO=40/60, se forman esferulitas con tamaños entre 300 y  $400\mu m$  (estimado por inspección visual). Las fotografías de PCL/PEO=40/60 y PCL/PEO=50/50 se aprecian en diferente tono pues

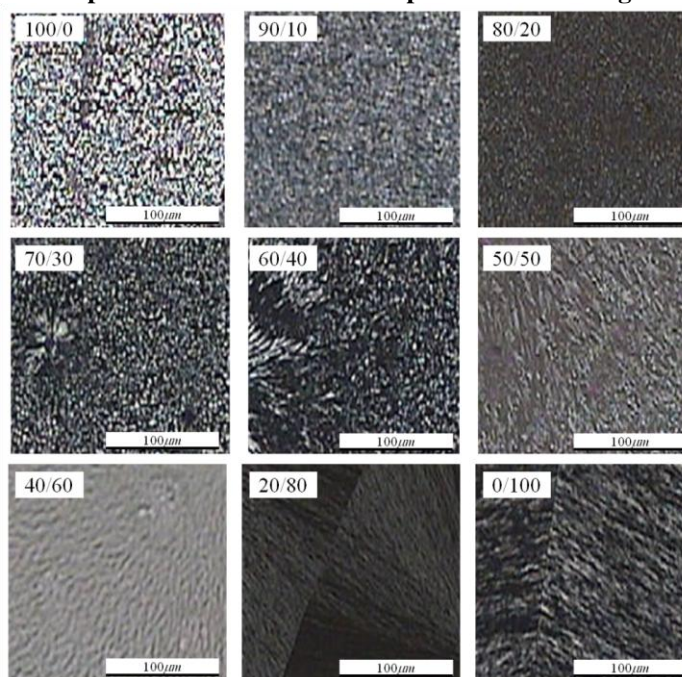


fue necesario retirar el filtro NCB11 para poder visualizar las zonas brillantes difíciles de definir, filtro que si fue utilizado para observar las demás composiciones. Por último, las composiciones PCL/PEO=20/80 y PCL/PEO=0/100 evidencian una estructura cristalina típica fácil de identificar a esta escala, con esferulitas que alcanzan inclusive  $2mm$  de ancho siendo evidente a simple vista.

**Figura 1–19. Películas de poliuretanos PCL/PEO (espesor aproximado  $100\mu m$ ) bajo microscopio óptico con luz polarizada.**

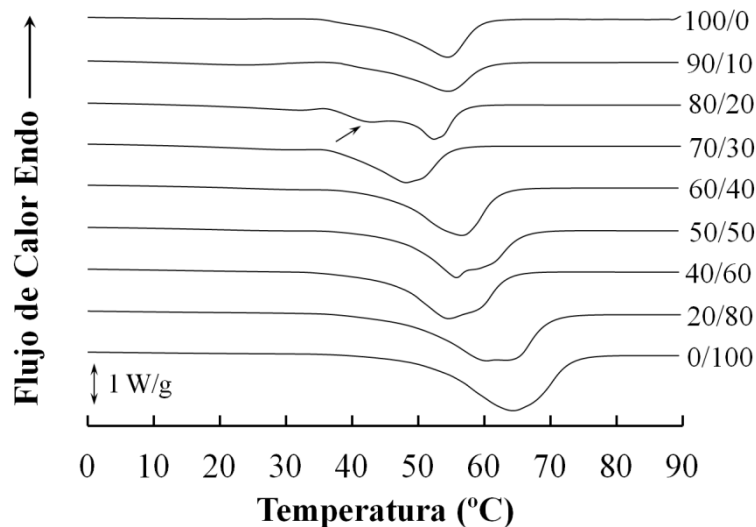


**Figura 1–20. Películas de poliuretanos PCL/PEG. Ampliación de las fotografías de la Figura 1–19**



En La Figura 1–21, sin incluir la zona de transición vítrea, se aprecia el primer calentamiento en DSC, en el cual se observan los picos de fusión de los cristales de los poliuretanos PCL/PEO, cristales que se han formado desde la solución del copolímero en cloroformo.

**Figura 1–21. Termogramas de DSC, primer calentamiento para poliuretanos de PCLPEO. Se identifica el pico de fusión adicional en la composición PCL/PEO=80/20**

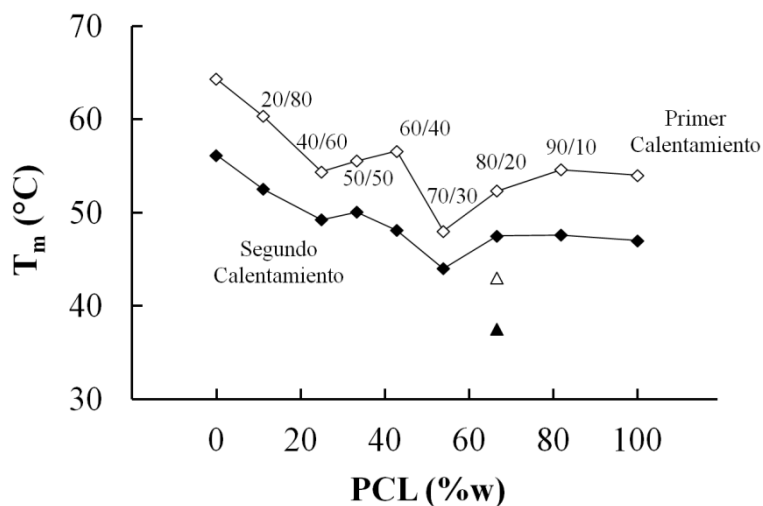


La temperatura de fusión, medida en el punto máximo de los respectivos picos de fusión en los termogramas DSC, y representados en la Figura 1–22, es menor en composiciones intermedias respecto a aquellas de los poliuretanos de PCL 100/0 y de PEO 0/100. Esto evidencia una interferencia entre los segmentos de PCL y PEO durante la cristalización, reduciendo el tamaño de las lamelas formadoras de cristal, fenómeno particularmente evidente para la composición PCL/PEO=70/30, cuya temperatura de fusión es la menor entre todas las composiciones. Se identifica además en la Figura 1–21 un pico de fusión adicional a menor temperatura para la composición PCL/PEO=80/20, y que también se representa en la Figura 1–22, indicio de la presencia de lamelas de diferentes tamaños en esta composición.

Para la caracterización mediante DSC las muestras se han preparado por evaporación de una disolución del copolímero en cloroformo, buen solvente para ambos componentes, por lo que puede esperarse que los ovillos de las cadenas de copolímero se encuentren mezclados homogéneamente en la disolución. Al evaporarse el disolvente, la separación de fases se lleva a cabo dada la propia inmiscibilidad entre la PCL y el PEO (Bogdanov *et al.* 1998, Qiu *et al.* 2003)

que haría que, incluso en ausencia de cristalinidad, los bloques de cada componente en el copolímero tendieran a formar dominios de tamaños nanométricos, como se encuentra frecuentemente en copolímeros en bloque de componentes inmiscibles (Sperling 2005).

**Figura 1–22. Temperatura de Fusión,  $T_m$ , de los poliuretanos PCL/PEO.  $\diamond$  y  $\blacklozenge$  corresponden al pico de fusión principal.  $\triangle$  y  $\blacktriangle$  corresponden al segundo pico de fusión de la composición PCL/PEO=80/20**

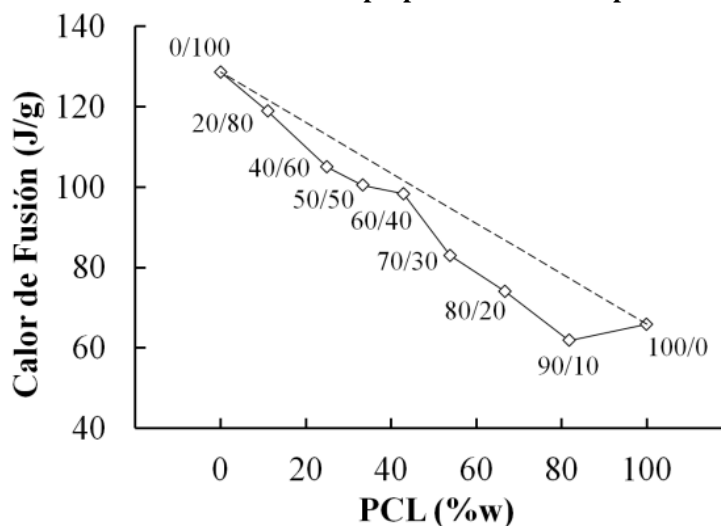


La formación de lamelas de PCL y lamelas de PEO requiere el plegado de sus propios bloques y también reunir bloques adyacentes para hacer crecer cristales de tamaños mayores que los que la longitud de un único bloque permitiría. Este efecto es muy claro en el caso de PEO, un polímero cuya cristalización desde la disolución o desde el fundido permite la formación de esferulitas de gran tamaño. Como se ve en la Figura 1–19, el hecho de interrumpir la cadena de PEO por parte de los grupos uretano no impide la formación de estas grandes esferulitas en el poliuretano de PEO 0/100, y la formación de la lamela parece ser capaz de apartar estos grupos a regiones amorfas inter-lamela sin que se vea impedido el crecimiento del cristal. En el copolímero PCL/PEO=20/80, el fenómeno podría ser similar: el crecimiento de las lamelas de PEO expulsaría los bloques de la PCL a regiones inter-lamela. Este fenómeno ha sido reportado en mezclas de PEO con otros polímeros con los que es miscible en fase líquida (Radhakrishnan *et al.* 1996). Es posible además que los pequeños cristales de PCL sirvan como núcleos para el crecimiento de cristales de PEO.

Tanto las imágenes de la Figura 1–19 y la Figura 1–20, como los termogramas de DSC del primer calentamiento en la Figura 1–21, prueban que los poliuretanos PCL/PEO cristalizan en cualquier composición, es decir, que la evaporación del disolvente conduce a la formación de lamelas

cristalinas de uno y otro componente. Sin embargo, la cristalización es parcial y por tanto las lamelas coexisten con una fase amorfa intercrystalina, donde cristales o bloques en fase amorfa de PCL están dentro de las regiones inter-lamela de las esferulitas de PEO. Esto puede deducirse de los valores del calor de fusión representados en la Figura 1–23, los cuales están por debajo de la línea recta que marca una relación lineal con la composición, es decir, valores menores del que tendrían si cada componente cristalizara en el poliuretano copolímero de igual manera que si cristalizara en su respectivo poliuretano homopolímero. El grado de cristalinidad no es posible calcularlo para composiciones intermedias dado que los cristales de PEO y PCL funden en el mismo intervalo de temperatura, formando un solo pico de fusión durante el calentamiento del DSC, por tanto el grado de cristalinidad es calculado solo para los poliuretanos de PEO 0/100 y de PCL 100/0 como se muestra en la Tabla 1–6.

**Figura 1–23. Calor de Fusión para poliuretanos PCL/PEO. La línea discontinua corresponde a una relación del calor de fusión proporcional a la composición.**



**Tabla 1–6. Grados de cristalinidad,  $X_c$ , de los poliuretanos de PCL 100/0 y de PEO 0/100**

PCL/PEO (mol/mol)	$\Delta H_m$ (J/g)	$X_c$ (%)
100/0	65,9	48,4
0/100	128,6	64,3

Las cadenas de PCL dificultan la cristalización de las cadenas de PEO y viceversa, así como la presencia de los segmentos formadores de grupos uretano, por tanto el calor de fusión y la temperatura de fusión se ven disminuidos. Sin embargo, no se presenta una total inhibición de la cristalización de igual manera a lo reportado en el estudio de cristalización de mezclas de PCL y

PEO (Chuang *et al.* 2006). Esto se sustenta en que los valores del calor de fusión son mayores que aquellos correspondientes a la cristalización de un solo componente. Por ejemplo, si la PCL no cristalizara en el poliuretano PCL/PEO=70/30, la entalpía de fusión sería máximo 60J/g correspondiente al PEO, mientras que el valor experimental es 83J/g, análisis que arroja el mismo resultado en todas las composiciones. Así, es posible calcular un déficit porcentual del calor de fusión,  $Def$ , que mide la diferencia entre el calor experimental y el esperado, según la Ecuación (1-14) y representado en función del contenido de PCL acorde a la Figura 1-24.

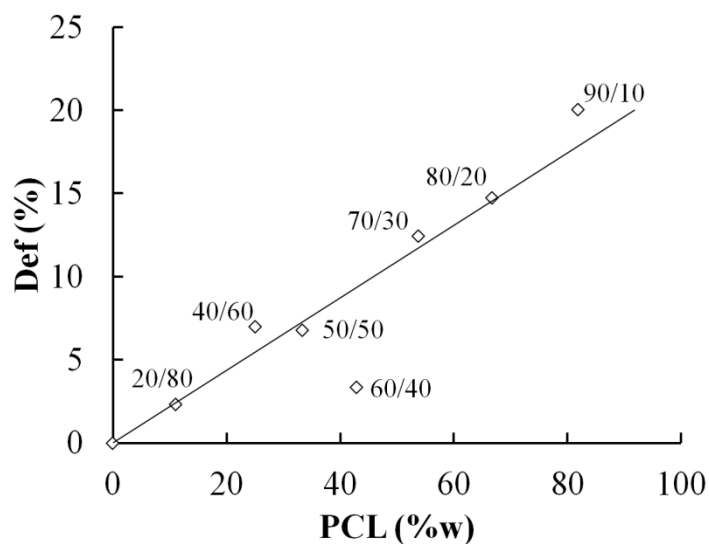
$$Def = \frac{\Delta H_{m,Max} - \Delta H_m}{\Delta H_m} \cdot 100 \quad (1-14)$$

Donde

$\Delta H_{m,Max}$  es la suma de los calores de fusión máximos esperados de PEO y PCL

$\Delta H_m$  es el calor de fusión experimental

**Figura 1-24. Déficit del Calor de Fusión,  $Def$ , en los poliuretanos PCL/PEO**



Esto demuestra que la cristalización de los poliuretanos PCL/PEO es impedida en mayor medida al aumentar el contenido de PCL y sigue una tendencia lineal, y puede ser asociado a diferentes cinéticas de cristalización en que el PEO al cristalizar en primer lugar limita la cristalización del PCL (Loh *et al.* 2008). La desviación en  $Def$  para PCL/PEO=60/40 concuerda con cristalizaciones simultáneas, y en menor medida restrictivas entre sí, como ha sido reportada para copolímeros en bloque de PEO y PCL en proporciones comparables (Nojima *et al.* 1992).

Todo esto es compatible con una estructura compuesta de regiones de esferulitas en las que lamelas de PCL encierran regiones amorfas con PCL y PEO y otras regiones en las que lamelas de PEO encierran regiones amorfas inter-lamela conteniendo también PCL y PEO; por supuesto en estas regiones amorfas también se encuentran los grupos uretano que no pueden ser parte de la estructura cristalina. Las imágenes de los poliuretanos PCL/PEO=60/40, PCL/PEO=50/50 y PCL/PEO=40/60, que muestra esferulitas de diferentes tamaños, apoyan este tipo de estructura como puede apreciarse en la Figura 1–19.

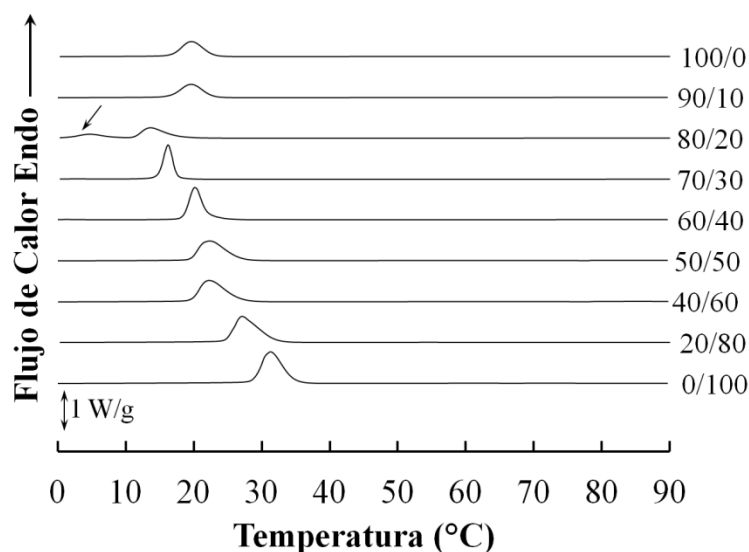
Otro detalle de interés en la Figura 1–21 es el pico de fusión durante el primer calentamiento. El proceso de fusión no puede interpretarse como característico de uno u otro componente en el poliuretano PCL/PEO, ya que PCL y PEO funden en el mismo intervalo de temperatura. El termograma de la muestra PCL/PEO=80/20 evidencia un pico de fusión, que se encuentra alrededor de 40°C, y que podría ser asociados a la fusión de lamelas de bajo espesor. El termograma DSC no permite identificar si estas lamelas de pequeño espesor son de uno u otro componente, pero podría asociarse a la formación de pequeños cristales de PEO dentro de las regiones confinadas por los cristales de PCL. Estos pequeños cristales estarían formados por la fracción de bajo peso molecular rica en PEO, cuya presencia se comprueba según los resultados de GPC.

El enfriamiento de las muestras, representado en la Figura 1–25, parte de un estado de inmiscibilidad entre la PCL y el PEO en estado fundido. De forma análoga a la fusión del primer calentamiento, las temperaturas de cristalización son menores en composiciones intermedias respecto a los poliuretanos de PCL 100/0 y de PEO 0/100 y también se presenta un doble pico de cristalización en la composición PCL/PEO=80/20, lo que podría ser indicio de la formación de dos tamaños de cristal de forma similar a la cristalización desde la disolución.

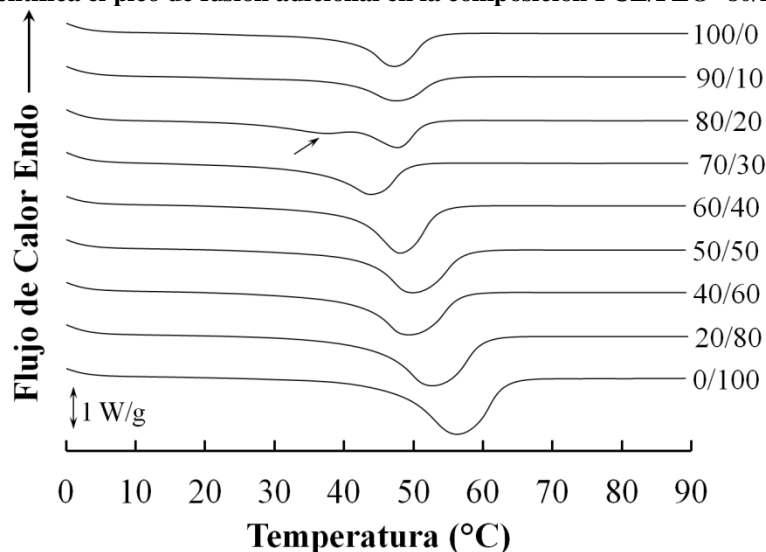
Este análisis de la cristalinidad de los poliuretanos PCL/PEO es coincidente con lo reportado por Nojima y colaboradores para copolímeros en bloque de PCL y PEO. Ellos describen una cristalización preferente del componente de mayor contenido, relegando las cadenas del componente minoritario hacia las capas amorfas entre las lamelas del cristal. Sin embargo, en contenidos comparables, los dos componentes cristalizan simultáneamente y los dos tipos de cristal coexisten dentro de una misma región cristalina. Durante la cristalización, se forma una estructura lamelar alternada de PEO y PCL influenciándose mutuamente, reduciendo el espesor de la lamela (o aumento de la fase amorfa intercristalina) y por tanto disminuyendo la temperatura de fusión en

estas composiciones con respecto a los homopolímeros (Nojima *et al.* 1992). Los barridos de fusión que se miden después de cristalizar la muestra desde el fundido en el segundo calentamiento, representado en la Figura 1–26, vuelven a mostrar igual comportamiento que el descrito para el primer calentamiento, lo que nuevamente confirma la mutua interferencia entre los componentes durante la cristalización esta vez desde el estado fundido, disminuyendo el tamaño de las lamelas cristalinas y por tanto la temperatura de fusión en composiciones intermedias. También se presenta una resuelta diferencia entre dos tipos de cristal para PCL/PEO=80/20, evidente en los dos picos de fusión, aunque no es posible asociar cada pico a uno u otro componente.

**Figura 1–25. Termogramas de DSC, enfriamiento después de borrar la historia térmica, para poliuretanos de PCL/PEO. Se identifica el pico de fusión adicional en la composición PCL/PEO=80/20**



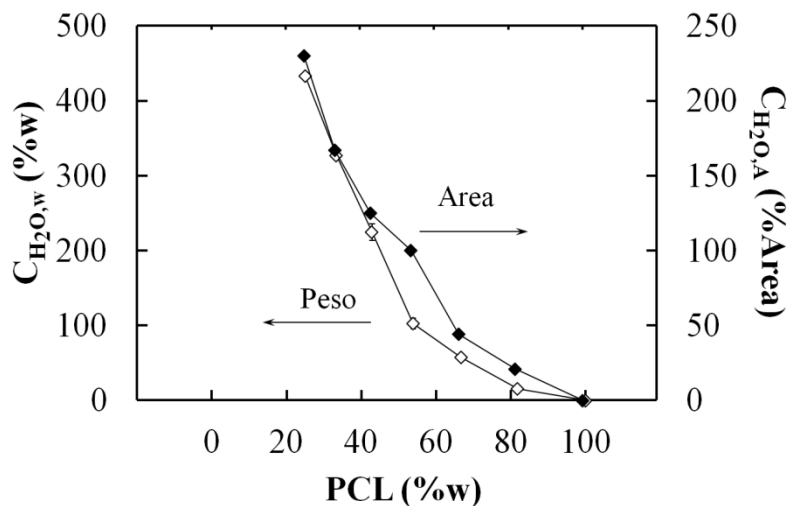
**Figura 1–26. Termograma de DSC, segundo calentamiento, para poliuretanos de PCL/PEO. Se identifica el pico de fusión adicional en la composición PCL/PEO=80/20**



### 1.3.5 Absorción de agua

En la Figura 1–27 se aprecian las ganancias en peso,  $C_{H_2O,w}$ , y en área,  $C_{H_2O,A}$ , de las muestras de los poliuretanos PCL/PEO después de su hidratación. Es evidente que a mayor contenido de PEO en los poliuretanos PCL/PEO, mayor es la cantidad de agua absorbida dada la alta hidrofiliicidad del PEO. El poliuretano de PCL 100/0 no obtuvo un hinchamiento apreciable, dada la naturaleza hidrofóbica de los bloques de PCL, mientras el poliuretano de PEO 0/100 se disolvió totalmente; la composición PCL/PEO=20/80 después de la hidratación no soportó la manipulación desarmándose con facilidad, esto debido a la alta hidrofiliicidad de las cadenas de PEO. Las demás composiciones mantuvieron su forma y consistencia a pesar del hinchamiento y su manipulación, lo cual es posible dada la presencia del enlace uretano entre los segmentos de PCL y PEO, situación que evita la total solubilización de las cadenas hidrofílicas de PEO.

Figura 1–27. Cantidad de agua absorbida por los polímeros PCL/PEO, en peso  $C_{H_2O,w}$  y en área  $C_{H_2O,A}$

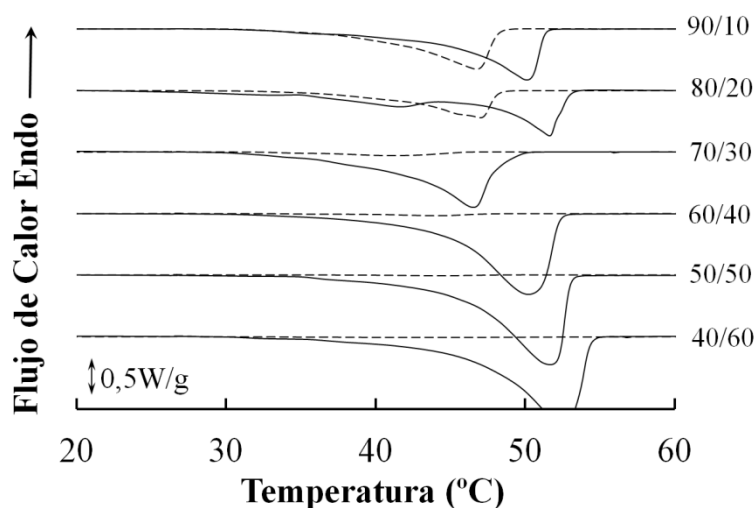


Los resultados de calorimetría de las muestras hidratadas evidencian picos de fusión más pequeños durante el calentamiento en DSC, representados en la Figura 1–28. Esto indica que la cantidad de cristales en los poliuretanos PCL/PEO ha disminuido por acción de la hidratación de las cadenas de PEO. También puede apreciarse que el pico de fusión no es solamente más pequeño, sino también se desplaza hacia menores temperaturas, ya que el agua actuando como impureza reduce el punto de fusión de los cristales. Esto es evidente en PCL/PEO=90/10 y PCL/PEO=80/20, y todavía apreciable en PCL/PEO=70/30, mientras en cantidades mayores de PEO el pico de fusión para los



poliuretanos hidratados es inexistente. La hidratación de las muestras se traduce en calores de fusión de menor valor respecto a las muestras secas, acorde con la Figura 1–29. Estos calores de fusión,  $\Delta H_{m,Pol}$ , fueron calculados con base en el peso de la muestra seca según la Ecuación (1–15).

**Figura 1–28. Termogramas de DSC para poliuretanos PCL/PEO secos (—) y después de su hinchamiento en agua (- - -), normalizado respecto al polímero seco.**



$$\Delta H_{m,Pol} = \Delta H_{m,Hid} \cdot \frac{m_{Hid}}{m_{Pol}} \quad (1-15)$$

Donde

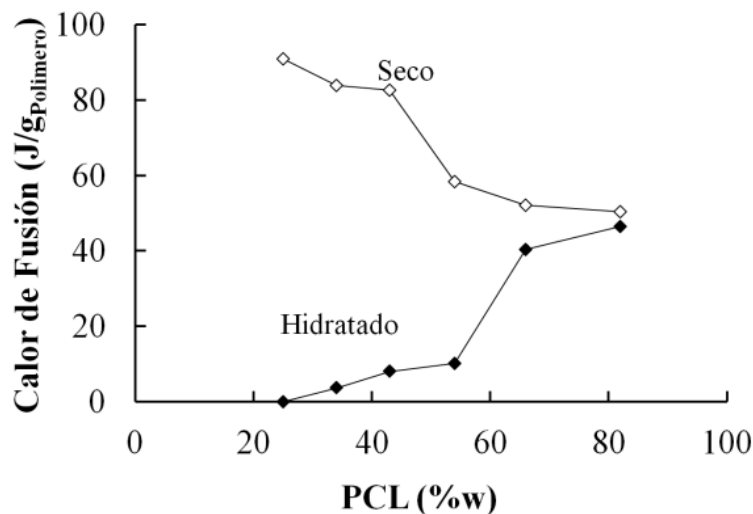
$\Delta H_{m,Hid}$  es el calor de fusión de la muestra hidratada, calculado a partir del área bajo la curva del termograma de DSC

$m_{Hid}$  y  $m_{Pol}$  son los pesos de la muestra hidratada y sin hidratar respectivamente.

El cambio en las características del pico de fusión puede atribuirse a la hidratación de las cadenas de PEO, y dada la presencia de agua dentro de la matriz polimérica, al tratarse de una impureza disminuye la temperatura de fusión; estas cadenas hidratadas, dados los enlaces uretano con las cadenas de PCL, no están en la capacidad de abandonar la matriz polimérica por acción de la hidratación, aunque la presencia de cadenas de bajo peso molecular, según los resultados de GPC, no descarta que algunas cadenas no enlazadas hayan salido durante la hidratación. Por otro lado, dada su hidrofobicidad, existe una reorganización de los cristales de PCL debida a la tensión impuesta por el hinchamiento de las cadenas de PEO, situación que se manifiesta en una mayor intensidad del pico de fusión en menores temperaturas.

Como se observa en la Figura 1–29, a partir de la composición PCL/PEO=70/30 hacia mayores contenidos de PEO, se presenta una baja cristalización indicando una total plastificación de las cadenas, convirtiendo la matriz polimérica del estado semicristalino a un estado amorfo; esta situación también podría asociarse a una mínima presencia de cristales de PCL en poliuretanos con alto contenido de PEO, como ha sido reportado para copolímeros en bloque de PCL y PEO (Nojima *et al.* 1992), por lo que la cristalinidad de estas muestras secas correspondería en mayor parte a los segmentos de PEO.

**Figura 1–29. Calor de fusión correspondiente a muestras de poliuretanos PCL/PEO hidratadas y secas**



### 1.3.6 Ensayos de Tensión

En la Figura 1–30 puede observarse el comportamiento de los poliuretanos PCL/PEO durante los ensayos de tensión; con propósitos comparativos, las curvas fueron desplazadas del origen y ubicadas con una diferencia de 2% de elongación entre ellas. Los datos del punto de fluencia y el punto de fractura se resumen en la Tabla 1–7. Dado que la temperatura de transición vítrea (entre -58 y -50°C) es menor que la temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) en que se realizaron los ensayos, todas las muestras son flexibles pero en menor medida para aquellas muestras con menor contenido de PEO. En líneas generales, el esfuerzo que soportan los poliuretanos PCL 100/0 y PEO 0/100 es mayor que el esfuerzo de las composiciones intermedias tanto en la fluencia como en la fractura, según puede apreciarse en la Tabla 1–7. El poliuretano de PCL 100/0 exhibe además alta resistencia a la tracción al fracturarse al 55% de elongación, mientras que el poliuretano de PEO 0/100 al 8% de elongación ya había mostrado signos de rasgado, a pesar de lo cual su estiramiento alcanza al menos 25%.

Figura 1–30. Curvas de Esfuerzo a partir de ensayos de tensión para los poliuretanos PCL/PEO a temperatura ambiente.

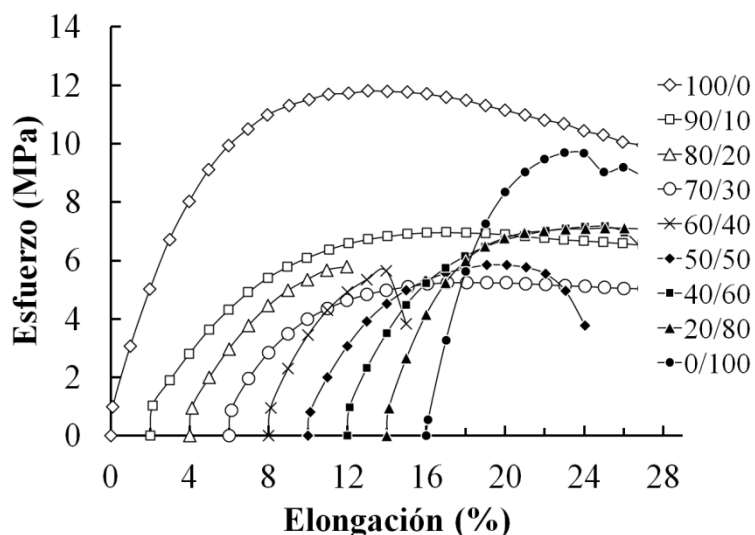


Tabla 1–7. Puntos de Fluencia y Fractura de los poliuretanos PCL/PEO a partir de las medidas de tensión a temperatura ambiente

PCL/PEO (mol/mol)	Fluencia		Fractura	
	Elongación (%)	Esfuerzo (MPa)	Elongación (%)	Esfuerzo (MPa)
100/0 <sup>1</sup>	10,1 ± 2,9	9,5 ± 2,4	55,0 ± 19,6	8,0 ± 1,9
90/10 <sup>1</sup>	18,3 ± 2,5	7,3 ± 0,3	46,2 ± 17,5	6,8 ± 0,2
80/20 <sup>2</sup>	--	--	8,8 ± 1,6	5,8 ± 0,0
70/30 <sup>1</sup>	17,9 ± 7,7	5,5 ± 0,3	65,8 ± 0,4	5,4 ± 0,4
60/40 <sup>2</sup>	--	--	5,6 ± 0,6	5,5 ± 0,2
50/50 <sup>1</sup>	9,8 ± 0,6	5,8 ± 0,2	15,3 ± 1,3	4,0 ± 0,3
40/60 <sup>3</sup>	11,5 ± 1,4	6,8 ± 0,4	11,8 ± 1,7	6,8 ± 0,5
20/80 <sup>3</sup>	11,4 ± 0,5	7,2 ± 0,2	37,7 ± 4,1	6,8 ± 0,2
0/100 <sup>3,4</sup>	7,5 ± 0,1	9,4 ± 0,4	7,9 ± 0,0	9,4 ± 0,4

<sup>1</sup> Muestras dúctiles, fractura después del punto de fluencia.

<sup>2</sup> Muestras frágiles, fractura antes de alcanzar el punto de fluencia.

<sup>3</sup> Rasgado de la muestra.

<sup>4</sup> Alcanza hasta 25% de elongación después del rasgado.

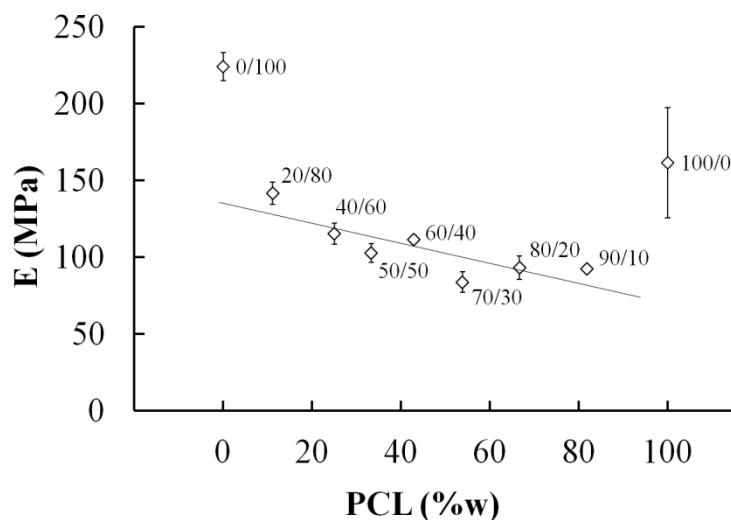
El comportamiento de la elongación antes de la fractura entre las composiciones PCL/PEO=80/20 y PCL/PEO=60/40 puede asociarse a un debilitamiento de las zonas intercristalinas en composiciones cercanas al 50%w de PCL, en que se presentaría una prominente segregación entre

los segmentos de PCL y PEO, según discusión de la sección 1.3.4, haciendo que dentro de las zonas amorfas las cadenas de un componente estén en mayor proporción, rodeando las regiones correspondientes al otro componente y produciendo grandes límites en extensión entre ellas. Por otro lado, en el poliuretano PCL/PEO=70/30, las fases de PCL y PEO estarían uniformemente distribuidas y en menores tamaños, lo que implica la existencia de pequeños límites entre estas zonas, lo cual se traduce en un mayor estiramiento de la matriz polimérica.

El módulo elástico,  $E$ , para la PCL se ha reportado por varios autores cercano a  $280\text{MPa}$  para un peso molecular alrededor de  $2 \times 10^4$  a temperatura ambiente (Averous *et al.* 2000, Vertuccio *et al.* 2009); para el PEO el módulo elástico se ha reportado alrededor de  $530\text{MPa}$  con peso molecular de  $3 \times 10^5$  a temperatura ambiente (Ogata *et al.* 1997, Yu *et al.* 2013); aunque no corresponden a polímeros iguales a los aquí estudiados, estos valores de  $E$  se utilizan aquí con fines comparativos, presentando valores cercanos al doble de los medidos para los poliuretanos de PCL 100/0 y de PEO 0/100 y representados en la Figura 1–31, lo que apunta hacia una naturaleza de mayor flexibilidad de los poliuretanos PCL/PEO respecto a los polímeros de PCL y PEO. Esto puede ser asociado a los segmentos de HMDI dentro de las cadenas, ya que estos segmentos se hallan en la fase amorfa, adjudicando mayor movilidad a las cadenas.

La Figura 1–31 muestra los valores de  $E$  de los poliuretanos PCL/PEO.

**Figura 1–31. Módulo Elástico,  $E$ , medido a temperatura ambiente y obtenido de pruebas de tensión para poliuretanos PCL/PEO. La tendencia lineal en composiciones intermedias es asociada al tamaño de esferulita.**

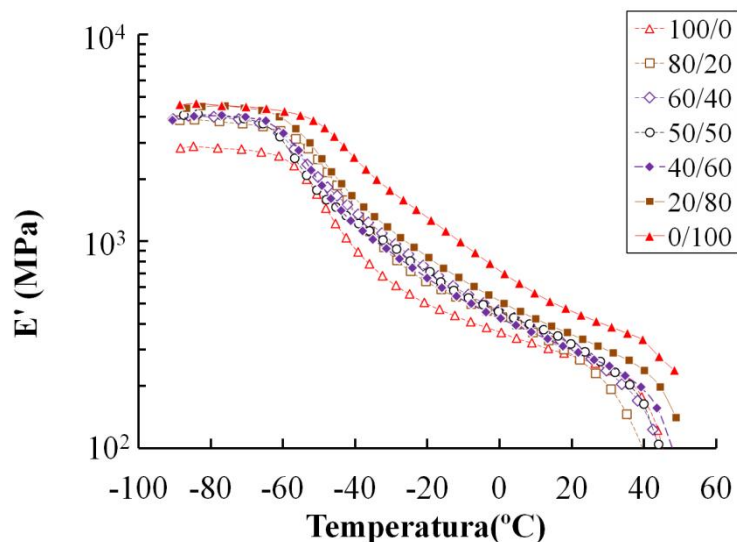


Los valores de  $E$  de los poliuretanos PCL/PEO no presentan valores proporcionales respecto a los correspondientes de los poliuretanos de PCL 100/0 y PEO 0/100, sino que exhiben módulos de menor valor, siendo estos valores concordantes con lo reportado para poliuretanos con segmentos de PCL y PEO ( $M_n \sim 2.000$ ), y peso molecular estimado aproximado de  $6 \times 10^4$  (Cometa 2010). El tamaño de cristal es determinante en el comportamiento del módulo elástico; a mayor tamaño de esferulita se obtiene un módulo elástico más alto, como en el caso de poliuretanos con alto contenido de PEO, con lo que podría aplicarse una tendencia lineal al módulo elástico para las composiciones intermedias de los poliuretanos PCL/PEO, según el tamaño de la esferulita.

### 1.3.7 Análisis Dinámico Mecánico (DMA)

Partiendo de altas temperaturas en el estado líquido, y ante una aplicación mecánica, el polímero responde mediante reordenamiento de grandes tramos de cadenas, a través de movimientos cooperativos en los que tramos de cadena arrastran a cadenas adyacentes. En polímeros semicristalinos, a temperaturas por debajo de la fusión y mayores que la transición vítrea, la movilidad de las cadenas principales a gran escala de la fase amorfa permite también movimientos de las lamelas cristalinas, que se deforma de manera similar a como lo haría un mazo de cartas. Al disminuir la temperatura, estos movimientos cristalinos se pierden en un proceso de relajación en el que el módulo de almacenamiento,  $E'$ , aumenta y se aprecia un pico en el factor de pérdida,  $Tan\delta$ , al disminuir la temperatura. En temperaturas menores que el punto de fusión, el principal proceso de relajación, denominado relajación  $\alpha$ , está asociado a la pérdida de movilidad de las cadenas que se encuentran en fase amorfa y suele asociarse con la transición vítrea.

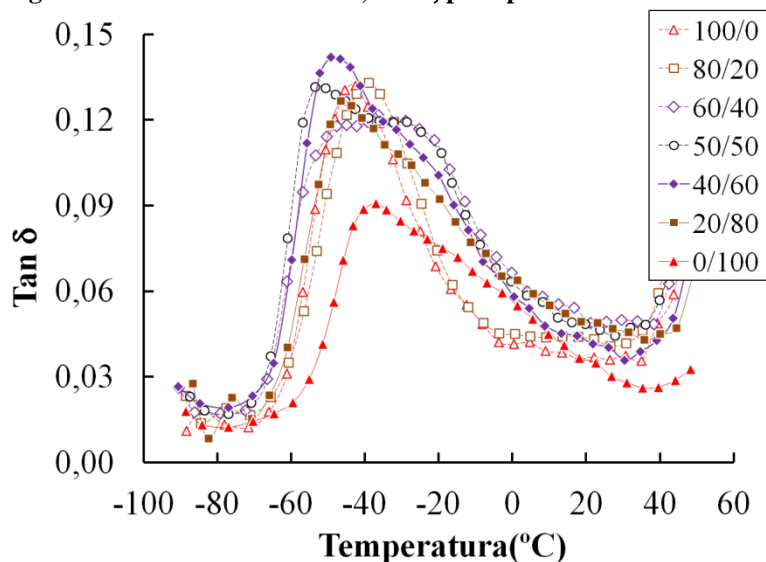
El comportamiento del módulo de almacenamiento,  $E'$ , que se aprecia en la Figura 1–32, es característico de las relajaciones  $\alpha$ . La caída del módulo en la relajación comienza alrededor de la temperatura de transición vítrea calorimétrica, pero para el poliuretano de PEO 0/100 se produce una caída continua hasta la temperatura de fusión, tendencia diferente a la caída característica que generalmente se produce en temperaturas superiores a la temperatura de relajación  $\alpha$ ,  $T_\alpha$ . En el estado vítreo, antes de la transición vítrea, se aprecia con claridad una menor rigidez en el poliuretano de PCL 100/0 respecto a las demás composiciones, manteniendo la tendencia hasta aproximadamente  $20^\circ C$ . Los valores de  $E'$  a temperatura ambiente, concuerdan con la tendencia del módulo elástico,  $E$ , medido en los ensayos de tensión, es decir, un menor valor para las composiciones intermedias respecto a lo que se esperaría proporcionalmente entre las composiciones extremas PCL/PEO=100/0 y PCL/PEO=0/100.

Figura 1–32. Módulo de Almacenamiento  $E'$  para poliuretanos PCL/PEO

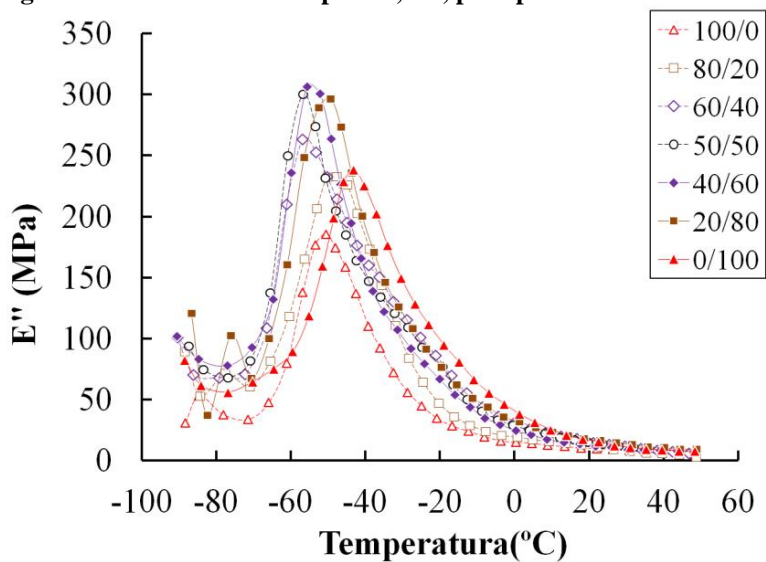
Teniendo presente que  $E'$  está relacionado con la capacidad del polímero de reaccionar de forma directa según la deformación aplicada, puede inferirse que mientras los segmentos mayoritarios son de PEO, el comportamiento de la matriz polimérica será rígida por este componente, pero a mayor contenido de PCL, la relación entre  $E'$  y la composición no sigue la misma tendencia, situación que podría asociarse a la independencia con que actúan las fases amorfas de PCL y PEO, según cuán segregadas estén entre ellas y de acuerdo a si están distribuidas homogéneamente con tamaños similares, o si existe una de ellas en mayor cantidad rodeando la otra y manteniéndola en regiones aisladas.

Con el objeto de identificar la temperatura en que se presenta la relajación  $\alpha$ ,  $T_\alpha$ , se suele ubicar en el valor máximo del factor de pérdida,  $\text{Tan}\delta$ , medida a la frecuencia de 1Hz para cada composición, según se aprecia en la Figura 1–33. Sin embargo, para las composiciones con altos contenidos de PEO, la forma característica de la curva  $\text{Tan}\delta$  está distorsionada entre -40 y -20°C, sobre todo en las curvas de PCL/PEO=50/50 y PCL/PEO=60/40, por tanto se ubica  $T_\alpha$  en los puntos máximos de las curvas de  $E''$  de la Figura 1–34. Los valores de  $T_\alpha$  así obtenidos son representados en la Figura 1–35 junto con los valores de  $T_g$  provenientes de los resultados de DSC. Se aprecia entonces una tendencia similar en ambas temperaturas en que los valores de  $T_\alpha$  son menores en las composiciones intermedias comparados con las composiciones

**Figura 1–33. Factor de Pérdida,  $Tan\delta$ , para poliuretanos PCL/PEO**



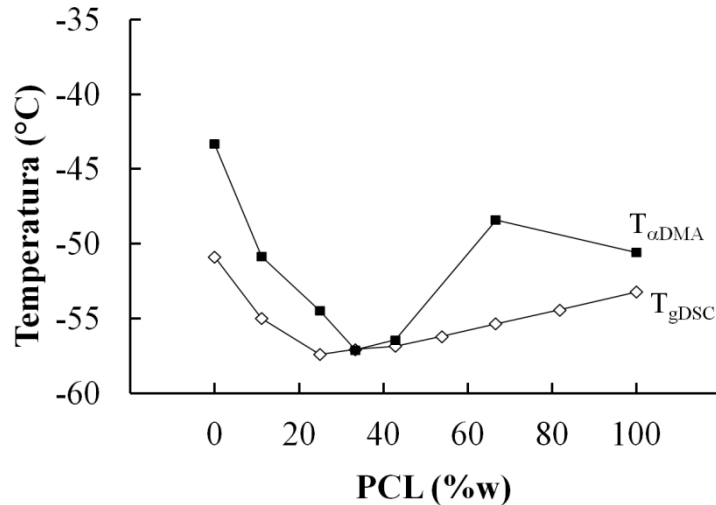
**Figura 1–34. Módulo de Disipación,  $E''$ , para poliuretanos PCL/PEO**



La distorsión de las curvas de  $Tan\delta$  en temperaturas mayores que  $T_{\alpha}$ , se presenta solamente con altos contenidos de PEO, lo que podría asociarse a la presencia de agua dado el carácter hidrofílico del PEO, pero se ha demostrado que los efectos que evidencia la humedad se manifiestan solamente a temperaturas inferiores a  $T_g$  (Calleja *et al.* 1991, Gómez Ribelles *et al.* 1992, Sabater i Serra *et al.* 2007). Dado que en los poliuretanos PCL/PEO hay dos fases amorfas separadas, la distorsión en las curvas de  $Tan\delta$  también podría relacionarse con una segunda transición vítrea, correspondiente a regiones amorfas ubicadas en zonas intercristalinas dentro de los cristales de PEO, que no adquirieron la movilidad suficiente en la  $T_{\alpha}$ , pero que a mayores temperaturas si

lograron esta relajación. Buscando describir la naturaleza de esta distorsión, se analizan las muestras utilizando la espectroscopía de relajación dieléctrica o DRS, cuyos resultados se describen en la sección 1.3.8

**Figura 1–35. Representación de la temperatura de transición vítrea a partir de DSC,  $T_{gDSC}$ , y su equivalente a partir de los datos de DMA,  $T_{\alpha DMA}$ , para los poliuretanos PCL/PEO**



### 1.3.8 Relajación Dieléctrica (DRS)

Muchos polímeros exhiben múltiples relajaciones, en los que las curvas del Factor de Pérdida Dieléctrica,  $\epsilon''$ , presenta varios máximos. Estas relajaciones son designadas como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , etc. según la temperatura decrece. En algunos polímeros semicristalinos la relajación que aparece a más alta temperatura es debida a movimientos de las lamelas cristalinas, en polímeros amorfos la relajación  $\alpha$ , o relajación principal, es debida a movimientos conformacionales, cooperativos, de las cadenas del polímero, es decir, tiene el mismo origen molecular que la transición vítrea. A una frecuencia del orden de  $10^{-3} Hz$ , la temperatura en la que aparece el máximo de  $\epsilon''$  correspondiente a la relajación dieléctrica  $\alpha$  está cerca de la  $T_g$  medida por calorimetría, mientras que a frecuencias más altas aparecerá a mayores temperaturas. La cooperatividad es el rasgo característico de la relajación  $\alpha$ , en la cual el reordenamiento de una cadena de polímero arrastra a varias más, en un proceso que globalmente puede involucrar a varias decenas o centenares de unidades monoméricas pertenecientes a varias cadenas del polímero.

Las relajaciones secundarias a menores temperaturas son atribuidas a movimientos locales de cadena, movimientos no cooperativos. En el análisis dieléctrico todas las relajaciones suceden a



mayores temperaturas a medida que la frecuencia aumenta. La ubicación de los valores máximos de  $\varepsilon''$  puede hacerse en las curvas de temperatura a frecuencia constante, o en curvas de frecuencia a temperatura constante (Avakian *et al.* 2002). Las relajaciones secundarias se deben a movimientos localizados de los enlaces de la cadena principal, involucrando entre 4 y 8 enlaces de la cadena (flexión y estiramiento) y a movimientos de cadenas laterales. Cuanto más pequeño es el grupo responsable de la relajación ésta aparece a una temperatura menor (Boyer 1968). En los poliuretanos PCL/PEO, a pesar de su naturaleza semicristalina, no existe ninguna relajación atribuible a la fase cristalina, ya que están ocultas por los procesos como la Conductividad DC o los fenómenos de polarización interfacial Maxwell-Wagner (Alig *et al.* 2006).

Se ha reportado que las cadenas de PEO exhiben tres relajaciones en temperaturas menores que el punto de fusión,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , de mayor a menor temperatura. La relajación debida a movimientos cristalinos muchas veces no es observada dada la alta influencia de la conductividad en altas temperaturas y a bajas frecuencias. La relajación  $\alpha$  se origina en movimientos cooperativos correspondientes a segmentos ubicados en regiones no cristalinas. La relajación de más baja temperatura,  $\gamma$ , ha sido asignada a movimientos locales de la cadena principal, únicamente en la fase amorfa, que permiten reorientar los dipolos permanentes de los grupos éter de la cadena bajo la acción del campo eléctrico aplicado. También se ha reportado una relajación intermedia entre  $\beta$  y  $\gamma$ , denominada en por algunos autores como  $\gamma'$ , y que ha sido asignada a la relajación de segmentos en la regiones entre fases (Jin *et al.* 2002).

Para las cadenas de PCL, también se ha reportado que la relajación  $\gamma$  de igual manera se asocia a movimientos locales dentro de las cadenas, que en este caso reorientan los dipolos presentes en el grupo éster, y la relajación  $\alpha$  se relaciona con la transición vítrea (Sabater i Serra *et al.* 2009). También se reporta la relajación  $\beta$ , pero como producto de la presencia de humedad dentro de la matriz polimérica, tanto en una red entrecruzada (Sabater i Serra *et al.* 2007), como parte de un poli (éster uretano) siendo la PCL el segmento blando (Bogdanov *et al.* 1999).

En la Figura 1–36 se presentan las curvas de la Permitividad,  $\varepsilon'$ , y en la Figura 1–37 las curvas del Factor de Pérdida Dieléctrica,  $\varepsilon''$ , para los poliuretanos de PCL 100/0 y de PEO 0/100 a una frecuencia de  $10^3 \text{ Hz}$  en función de la temperatura, y que ilustran la forma de las curvas características para los poliuretanos PCL/PEO. La curva de  $\varepsilon'$  permite identificar las relajaciones  $\alpha$

para la PCL y el PEO pero no son evidentes las relajaciones  $\beta$  ni  $\gamma$ , dada su baja intensidad. Así, la curva de  $\epsilon''$  en efecto permite ubicar adicionalmente la relajación  $\gamma$ , y a primera vista parece no existir la relajación  $\beta$ , en ninguna de las frecuencias utilizadas. En la curva correspondiente al PEO es evidente un aumento pronunciado de  $\epsilon''$ , a altas temperaturas, que es debido al aumento en la conductividad del polímero, lo que impide a bajas frecuencias la ubicación de las relajaciones.

Figura 1-36. Permitividad,  $\epsilon'$ , para los poliuretanos de PCL 100/0 y de PEO 0/100 a  $10^3\text{Hz}$ .

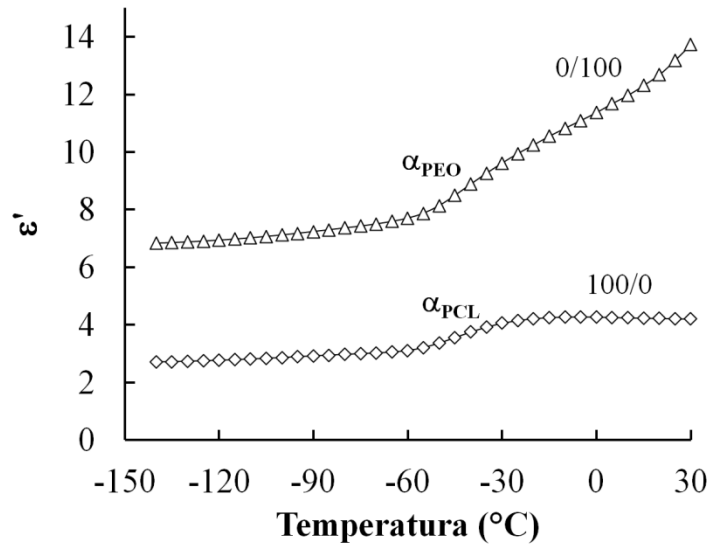
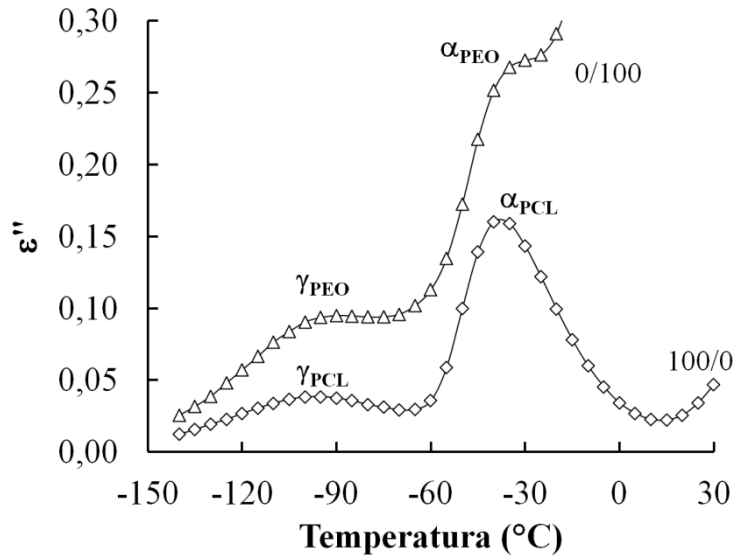
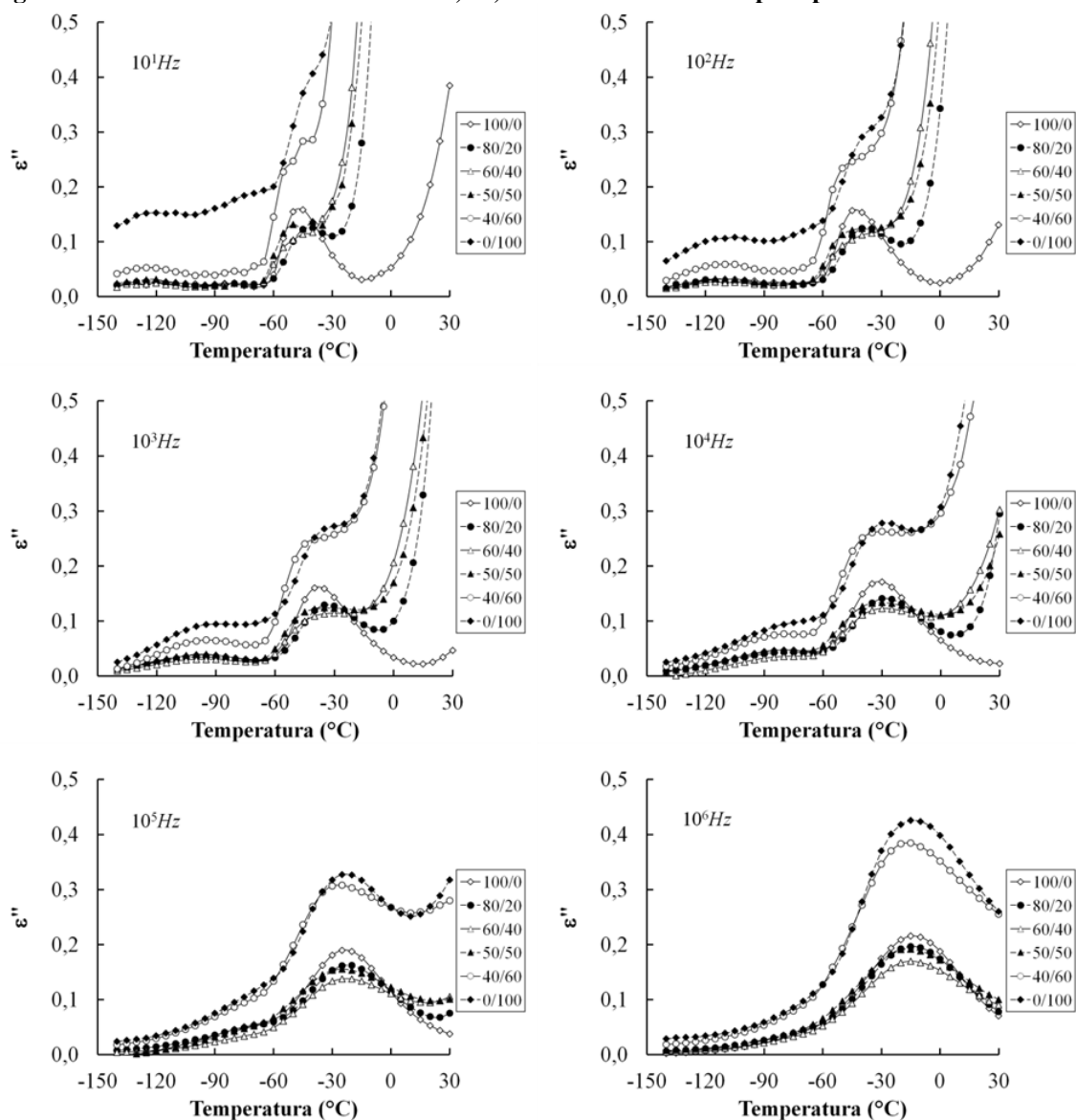


Figura 1-37. Factor de Pérdida Dieléctrica,  $\epsilon''$ , para los poliuretanos PCL 100/0 y de PEO 0/100 a  $10^3\text{Hz}$ .



Se ubican entonces solamente las relajaciones  $\alpha$  y  $\gamma$ , según la Figura 1–38, aunque en composiciones intermedias estas relajaciones no pueden ser identificadas como correspondientes a la PCL o al PEO de forma independiente. En este proceso, se analizan solamente las frecuencias mayores a  $10\text{Hz}$ , ya que en menores frecuencias se producen curvas con gran cantidad de ruido, lo que no permite identificar pico alguno. Para mayor claridad, se muestran solamente algunas curvas, pero en total se analizan 31 curvas por cada composición desde  $10$  hasta  $10^7\text{Hz}$ .

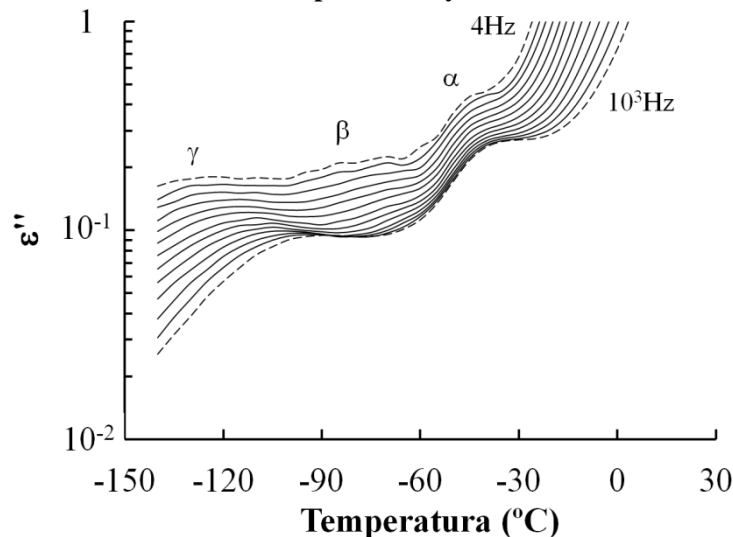
**Figura 1–38. Factor de Pérdida Dieléctrica,  $\epsilon''$ , a frecuencia constante para poliuretanos PCL/PEO**



En la Figura 1–38 se observa que las relajaciones  $\alpha$  son más evidentes en elevadas frecuencias y altas temperaturas, mientras que las relajaciones  $\gamma$  lo son a bajas frecuencias y bajas temperaturas. A medida que el contenido de PEO se incrementa, el efecto de la conductividad se hace más evidente en bajas frecuencias, lo que solo permite la lectura de la relajación  $\alpha$  en elevadas frecuencias. Es destacable la coincidencia de la posición de las relajaciones dieléctricas del PEO y la PCL en temperatura y frecuencia, pese a sus diferentes orígenes moleculares, lo que representa una dificultad al analizar los espectros de relajación en los poliuretanos de diferentes composiciones. La Figura 1–38 también evidencia que las relajaciones  $\alpha$  y  $\gamma$  para ambos componentes, se presentan en temperaturas similares entre sí en cada frecuencia. Esto no debe ser identificado como evidencia de una zona amorfa homogénea, ya que existe separación de fases entre los segmentos de PEO y PCL, según discusión presentada en la sección 1.3.4.

La curva de  $\varepsilon''$  a  $10\text{Hz}$  correspondiente al poliuretano de PEO 0/100, describe una forma entre  $-90$  y  $-60^\circ\text{C}$  que podría ser asociada con un posible pico, intervalo en el que se esperaría encontrar la relajación  $\beta$  correspondiente al PEO (Jin *et al.* 2002). Para un mejor análisis, se construyen en escala logarítmica las curvas de  $\varepsilon''$  entre  $4$  y  $10^3\text{Hz}$ , según la Figura 1–39. Puede apreciarse que efectivamente a bajas frecuencias no existe la concavidad que si hay entre las relajaciones  $\alpha$  y  $\gamma$  en altas frecuencias, lo que podría corresponder a la relajación  $\beta$ , y por tanto confirmar su presencia en el poliuretano de PEO 0/100. Desafortunadamente, las curvas a bajas frecuencias muestran grandes distorsiones que no permiten diferenciar entre ruido y el pico de relajación, además del ya descrito efecto de la conductividad en el análisis del PEO, por tanto no es posible ajustar modelo alguno a la relajación  $\beta$ .

**Figura 1–39. Relajaciones  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  para el poliuretano de PEO 0/100. Las líneas discontinuas corresponden a  $4$  y  $10^3\text{Hz}$ .**



Dado el efecto de la conductividad sobre la curva de  $\varepsilon''$ , los datos recogidos de los ensayos de DRS no permiten concluir respecto a la distorsión que se observa en las medidas de DMA de la Figura 1–33 para las composiciones ricas en PEO, en mayores temperaturas que la transición vítrea. Por tanto no es posible aportar elementos adicionales para describir si se trata de una segunda transición vítrea, dados los dos tipos de fase amorfa presentes.

Así, con el objeto de ajustar los datos obtenidos a modelos comúnmente utilizados en la técnica de DRS, se identifica el punto máximo en la curva  $\varepsilon''$ , el cual determina la temperatura a la que se presentan las relajaciones  $\alpha$  y  $\gamma$  que pudieron ser identificadas para los poliuretanos PCL/PEO. En ambos casos se precisa su correspondiente Tiempo de Relajación,  $\tau$ , en función de la frecuencia,  $f$ , según la Ecuación (1–16).

$$\tau = \frac{1}{2\pi \cdot f} \quad (1-16)$$

Una vez ubicados los puntos máximos para todas las composiciones, se construyen las curvas  $\text{Log } \tau$  vs  $T/1000$ , tanto para la relajación  $\gamma$  como para la relajación  $\alpha$ , según la Figura 1–40 y la Figura 1–41 respectivamente. Los puntos fueron leídos solamente en las curvas de  $\varepsilon''$  donde el máximo era inequívoco, pues en las curvas correspondientes a las composiciones ricas en PEO, el efecto de la conductividad impide su localización. La relación entre temperatura y frecuencia, para las relajaciones  $\gamma$ , se expresa en términos del modelo de Arrhenius (Roland 1999), según la Ecuación (1–17) y ajustando los valores  $E_a$  y  $A$  se obtienen los datos que se presentan en la Tabla 1–8.

$$\tau(T) = A \cdot e^{\left(\frac{E_a}{R \cdot T}\right)} \quad (1-17)$$

Donde:

$A$  [s]: Factor pre exponencial

$E_a$  [J/mol]: Energía de activación

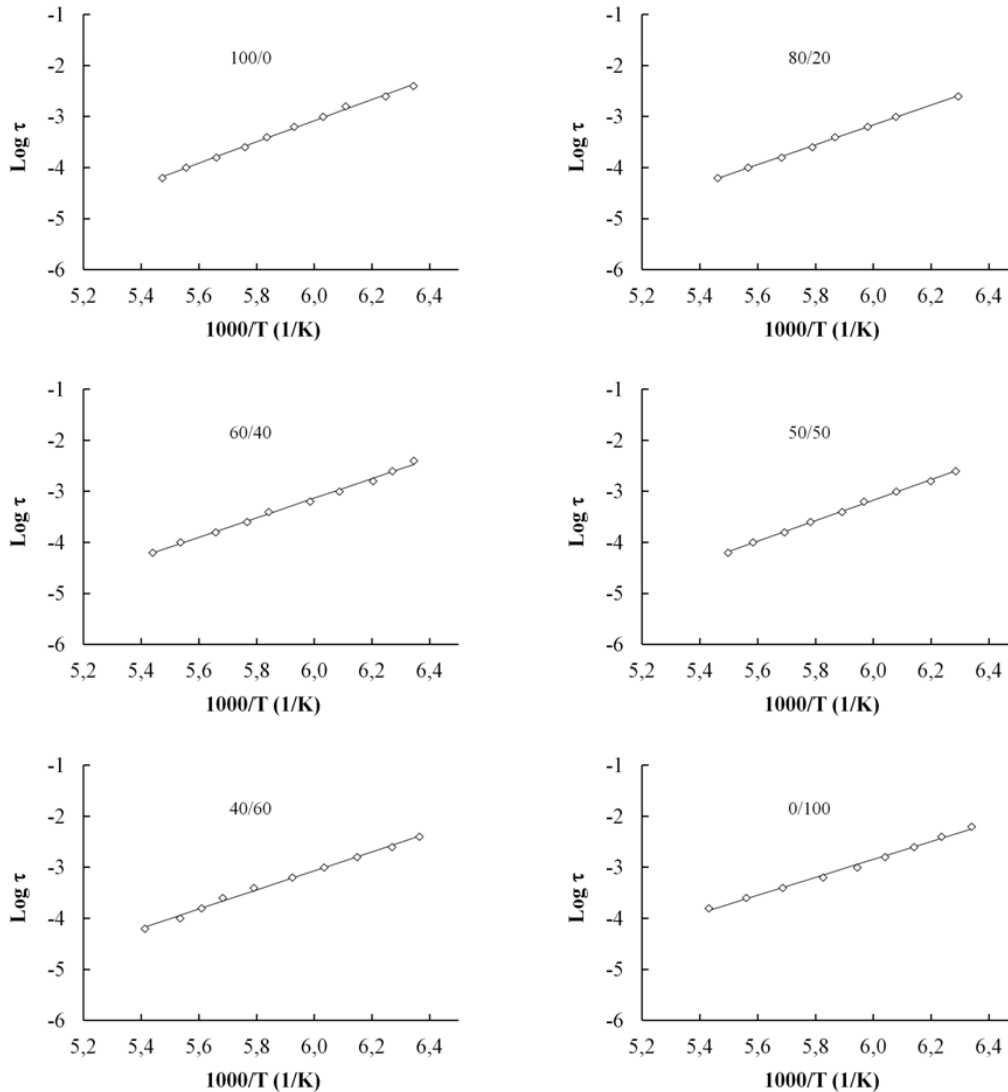
$R$ : Constante de los gases:  $8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$

$T$  [K]: Temperatura asociada a la relajación  $\gamma$ , donde  $\varepsilon''$  es máximo.

Los valores de  $A$  y  $E_a$  para el poliuretano de PCL 100/0 corresponden con los reportados en la literatura:  $3,8 \times 10^{-16} \text{ s}$  y  $37,1 \text{ kJ/mol}$  respectivamente (Sabater i Serra *et al.* 2009), lo que confirma

que durante la relajación  $\gamma$ , los segmentos de la PCL en los poliuretanos PCL/PEO presentan los mismos movimientos localizados que la PCL en estado puro. Por el contrario, el valor de  $E_a$  reportado para el PEO,  $15\text{kJ/mol}$  (Jin *et al.* 2002), no es coincidente con el obtenido para el poliuretano de PEO 0/100, aunque si se encuentra en el mismo orden de magnitud.

**Figura 1–40. Ajuste al modelo de Arrhenius para las relajaciones  $\gamma$  medidas por DRS para los poliuretanos PCL/PEO**



Esto evidencia una diferencia en los movimientos localizados que presenta la fase amorfa del PEO en los poliuretanos PCL/PEO. La energía de activación aparente de la relajación  $\gamma$  del PEO es menor que la de la PCL y en general, al aumentar el contenido de PEO en los poliuretanos, la energía de activación,  $E_a$ , disminuye. Sin embargo este efecto debe atribuirse solamente a la

superposición de las relajaciones debidas a uno y otro componente. Al tratarse de relajaciones secundarias, las barreras de energía que se oponen a los movimientos que originan la relajación son de tipo local y por lo tanto no es de esperar que la presencia de un componente del copolímero tenga influencia sobre la energía de activación del otro componente.

**Tabla 1–8. Valores de las constantes según el ajuste al modelo de Arrhenius en los poliuretanos PCL/PEO para las relajaciones  $\gamma$ .**

<b>PCL/PEO (mol/mol)</b>	<b>A (s)</b>	<b>E<sub>a</sub> (kJ/mol)</b>
100/0	$2,8 \times 10^{-16}$	40
80/20	$1,5 \times 10^{-15}$	37
60/40	$2,2 \times 10^{-15}$	37
50/50	$5,6 \times 10^{-16}$	39
40/60	$5,2 \times 10^{-15}$	36
0/100	$4,0 \times 10^{-14}$	34

De manera análoga, la relación entre  $\tau$  y  $T$  para las relajaciones  $\alpha$  se expresa en términos del modelo de Vogel-Fulcher-Tamman-Hesse VFTH (Roland 1999) según la Ecuación (1–18), ajustando los valores  $\tau_0$ ,  $B$ , y  $T_0$ , y obteniendo los datos que se presentan en la Tabla 1–9.

$$\tau(T) = \tau_0 \cdot e^{\left(\frac{B}{T-T_0}\right)} \quad (1-18)$$

Donde:

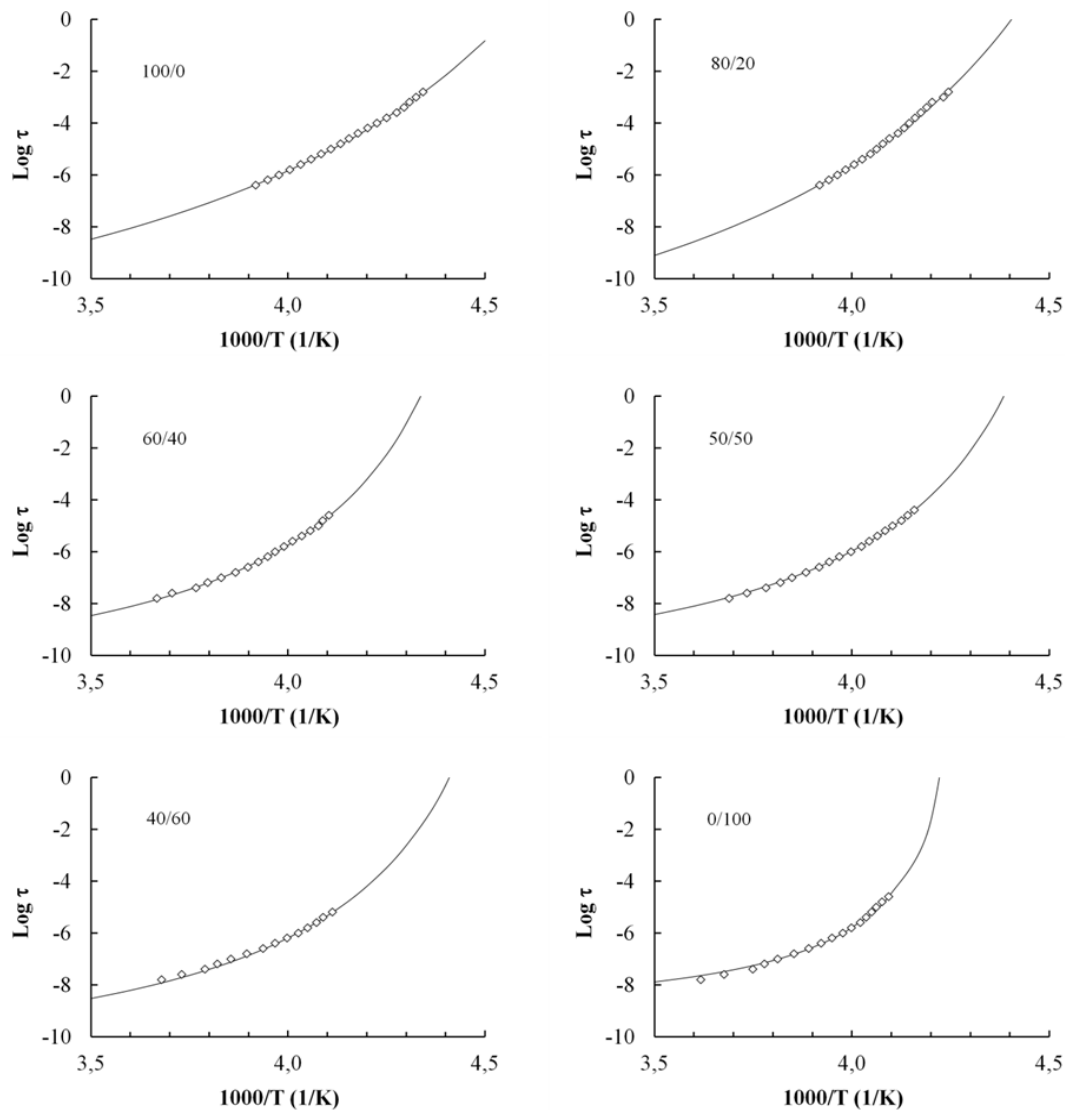
$\tau_0$ [s]: Tiempo de Relajación para un valor infinito de temperatura

$B$ [K]: Constante

$T_0$ [K]: Temperatura de Vogel, donde los movimientos de cadena están congelados

$T$  [K]: Temperatura asociada a la relajación  $\alpha$ , donde  $\varepsilon''$  es máximo.

Revisando la literatura, no se hallan reportados valores del modelo VFTH para la relajación  $\alpha$  del PEO, muy seguramente por la alta conductividad que limita su identificación en la técnica dieléctrica. Para los poliuretanos PCL/PEO se encuentran valores de  $B$  significativamente menores y valores de  $T_0$  mayores que en la PCL pura, es decir el diagrama presenta mayor curvatura como se puede apreciar en la Figura 1–41. Para la PCL se han reportados valores de  $1,3 \times 10^{-13}$ s, 1.700K y 167K para  $\tau_0$ ,  $B$ , y  $T_0$  respectivamente (Sabater i Serra *et al.* 2009), que se aproximan a los obtenidos para el poliuretano de PCL 100/0.

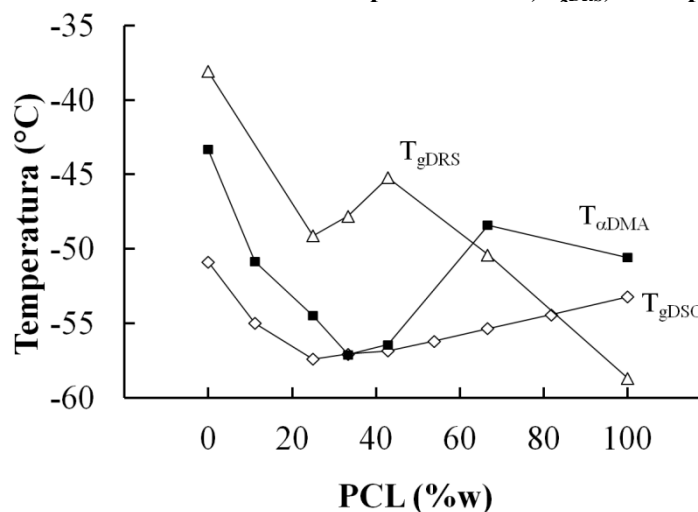
**Figura 1–41. Ajuste al modelo de Vogel-Fulcher-Tamman-Hesse para las relajaciones  $\alpha$  de los poliuretanos PCL/PEO****Tabla 1–9. Valores de las constantes según el ajuste al modelo VFTH de los poliuretanos PCL/PEO para las relajaciones  $\alpha$ .**

PCL/PEO (mol/mol)	$\tau_0$ (s)	B (K)	$T_0$ (K)
100/0	$1,6 \times 10^{-14}$	1.320	178
80/20	$8,6 \times 10^{-16}$	1.329	189
60/40	$4,0 \times 10^{-12}$	500	212
50/50	$5,7 \times 10^{-12}$	500	209
40/60	$5,1 \times 10^{-12}$	499	208
0/100	$6,9 \times 10^{-10}$	168	228



Utilizando las constantes del modelo VFTH, se procede a hallar las temperaturas de relajación  $\alpha$  correspondientes al tiempo de relajación  $\tau=100s$ , que es el tiempo de relajación ampliamente utilizado para hallar la temperatura de transición vítrea dieléctrica,  $T_{gDRS}$ , y así ser comparada con los valores obtenidos mediante DMA y DSC, según la Figura 1-42. Es de esperarse que el comportamiento de las temperaturas que describen el paso del estado vítreo al estado fundido sea similar en las tres técnicas de medición utilizadas. La tendencia común, desde un 100% de PEO, es la disminución de la temperatura hasta aproximadamente un 25%w de PCL; con un contenido mayor de PCL,  $T_{gDRS}$  presenta una total desviación de la tendencia que los resultados de DMA y DSC mostraron.

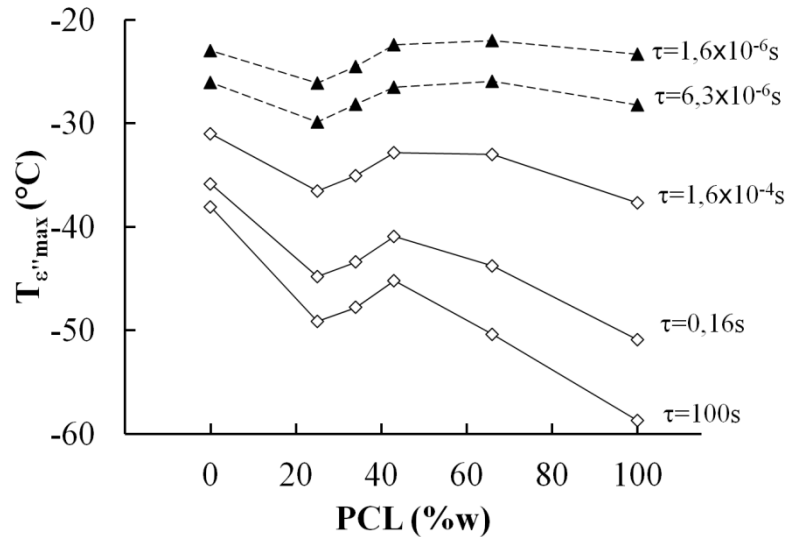
**Figura 1-42. Temperatura de transición vítrea a partir de DSC,  $T_{gDSC}$ , su equivalente a partir de DMA,  $T_{\alpha DMA}$ , y la transición vítrea dieléctrica a partir de DRS,  $T_{gDRS}$ , en los poliuretanos PCL/PEO.**



Es necesario tener presente que el modelo VFTH predice la transición vítrea dieléctrica  $T_{gDRS}$  a partir de datos experimentales, pero estos están alejados del tiempo de relajación requerido,  $\tau=100s$ , dado el ruido en bajas frecuencias y el efecto de la conductividad sobre las curvas de  $\epsilon''$ , siendo  $\tau=6,3 \times 10^{-6}s$  el máximo valor disponible. Por tanto, para verificar la tendencia de la temperatura de relajación  $\alpha$  medida por DRS se construye la Figura 1-43, en la cual se puede apreciar las diferentes tendencias entre los datos estimados a bajas frecuencias y los datos experimentales a altas frecuencias, presentando estos últimos un comportamiento menos variable que la  $T_{gDRS}$ , medida en  $\tau=100s$ , comportamiento que no es replicado por el modelo VFTH a bajas frecuencias. Sin embargo, las constantes del modelo VFTH son similares entre el poliuretano PCL 100/0 y lo reportado para la PCL (Sabater i Serra *et al.* 2009), pero no hay datos reportados contra

los que contrastar los valores del modelo VFTH para el poliuretano de PEO 0/100 y las demás composiciones.

**Figura 1–43. Temperaturas de relajación  $\alpha$  experimentales ( $\blacktriangle$ ) mediante DRS y estimadas ( $\diamond$ ) mediante el modelo VFTH, para los poliuretanos PCL/PEO.**



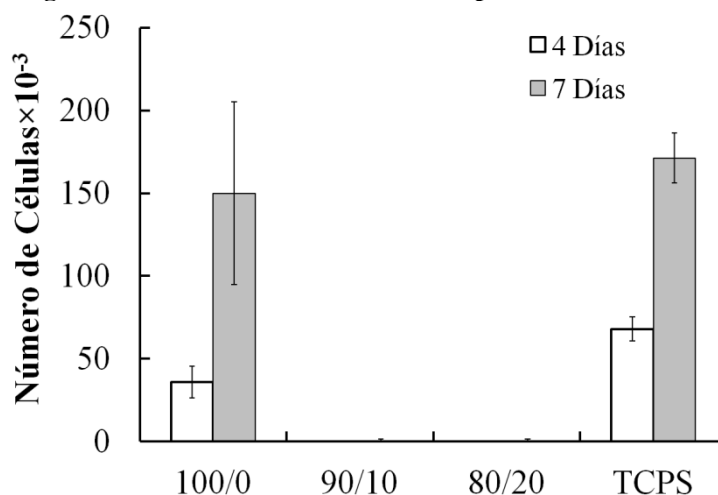
### 1.3.9 Comportamiento Celular

Para evaluar el comportamiento celular sobre los poliuretanos PCL/PEO, se realizaron y evaluaron unos cultivos usando un ensayo metabólico de la línea celular osteoblástica de ratón, basado en el compuesto MTS (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxyphenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium), según se describe en el Anexo A.

Como se observa en la Figura 1–44, la adhesión sobre el poliuretano de PCL 100/0 es similar al control de poliestireno tratado para cultivo celular TCPS (*Tissue Culture Polystyrene*). Al incluir PEO en la matriz polimérica, se elimina totalmente la adhesión celular debido a la inhibición de la adsorción de proteínas, dada precisamente la presencia del PEO en la superficie (Hubbell 2007, Saltzman 2000). Esta limitada adhesión sobre los poliuretanos que contienen PEO, permite que las células sean aspiradas fácilmente al utilizarse una micropipeta para succionar el medio y adicionar medio nuevo. Por otra parte, se observó durante el cultivo sobre muestras de las composiciones PCL/PEO=90/10 y PCL/PEO=80/20, que se redujo la cantidad de células adheridas en el fondo del pocillo, y que éstas adoptaban una morfología redondeada en vez de la morfología aplanada y extendida, típica de cultivos 2D. Esto podría estar relacionado con la liberación de cadenas de bajo peso molecular ricas en PEO y que permanecen disueltas en el medio. Esto podría explicarse

debido al bajo peso molecular, pues a pesar que el peso molecular promedio de los poliuretanos PCL/PEO es mayor respecto a los macrómeros PCLdiol y PEO4000 (Tabla 1–5), en el polímero final todavía existen cadenas de estos macrómeros, que al no estar enlazadas químicamente a cadenas de mayor peso molecular, y para el caso específico de PEO4000, pueden ser disueltas y lixiviadas fuera de la matriz polimérica hacia el medio de cultivo, lo que afectaría desfavorablemente el desarrollo de las células tanto en la muestra como en el fondo del pocillo.

**Figura 1–44. Adhesión celular sobre los poliuretanos PCL/PEO**



El contenido de PEO mínimo aquí estudiado corresponde a la composición PCL/PEO=90/10 (18%w PEO), menor al 25%w reportado como adecuado para la adhesión de fibroblastos (Cometa *et al.* 2010). Esta diferencia de resultados puede atribuirse a la longitud del segmento de PEO, que es el doble para el presente estudio respecto a lo reportado en la literatura, lo que podría formar zonas hidrofílicas de mayor tamaño lo que trae como consecuencia la inhibición de la adhesión celular. También es necesario tener presente que las células utilizadas para evaluar la proliferación sobre los poliuretanos PCL/PEO en el presente estudio son osteoblastos, células de características y funciones diferentes a aquellas correspondientes a los fibroblastos.

Por tanto, los poliuretanos PCL/PEO en las composiciones estudiadas, exceptuando 100/0, no son adecuados para cultivos en dos dimensiones, es decir, con la incorporación del PEO y la PCL mediante la síntesis de poliuretanos, se facilita la degradación de la matriz polimérica dado el aumento de la hidrofiliidad, como se ha reportado en pruebas de degradación hidrolítica para este tipo de poliuretanos (Cometa 2010), pero al mismo tiempo se han perdido las propiedades de adherencia característica de la PCL.



## **2. PARTE II: POLIURETANOS DE ALTO PESO MOLECULAR Y LIBERACIÓN DE RISEDRONATO DE SODIO**

Se describe en esta sección la síntesis y caracterización de copolímeros a partir de los macrómeros PCLdiol y PEO4000, utilizando el HMDI para formar el poliuretano. Con el fin de mejorar las propiedades de los poliuretanos PCL/PEO sintetizados y descritos en la sección 1, en esta oportunidad se utilizan mayores contenidos de HMDI para aumentar el peso molecular, y a su vez se reduce la concentración del PEO, para así obtener materiales que se espera sean aptos para permitir la adhesión de osteoblastos. La composición de los copolímeros estudiados en esta sección es referida también en relación molar y nombrada además con el sufijo HMW, siendo la expresión PCL/PEO-HMW la notación utilizada en esta sección, para así ser diferenciados de los poliuretanos PCL/PEO estudiados en la sección anterior. El Risedronato de Sodio (RSD) adsorbido en partículas de Hidroxiapatita (HAp), se incorpora a los poliuretanos PCL/PEO-HMW y estudia sus efectos en la proliferación de los osteoblastos sobre su superficie.

### **2.1 ESTADO DEL ARTE**

La labor de la ingeniería tisular actualmente se enfoca, entre otros, en el estudio de materiales para fines muy específicos: liberación de fármacos y reparación de tejidos. En el campo de la regeneración ósea, dos propiedades son importantes para los materiales de implante biocompatibles: la osteoconductividad y la capacidad de osteoinducción. La osteoconductividad es esencialmente una propiedad física, en que los materiales deben permitir la adhesión celular y permitir la migración de estas células hacia el interior del implante (poros de tamaño adecuado y estructura interconectada). La osteoinducción es la capacidad de un material o una sustancia de favorecer la diferenciación osteogénica de células progenitoras (por ejemplo, células madre mesenquimales procedentes de la médula ósea); esta propiedad puede ser modulada por la liberación de factores de crecimiento como los BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*), o la liberación de fármacos. Con este fin, se desarrollan materiales que permitan la liberación de fármacos o factores con cinéticas apropiadas para la remodelación del tejido. Para ello, es

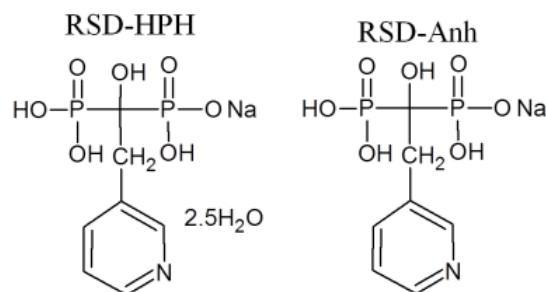
necesario estudiar y conocer la capacidad de carga de fármaco y su cinética de liberación en los materiales implantables dentro del tejido.

A pesar que los poliuretanos PCL/PEO estudiados previamente en esta tesis no permiten la adhesión de osteoblastos sobre su superficie dada la presencia del PEO, la capacidad osteoconductiva de otros copolímeros en bloque basados en PCL y PEO si está demostrada al permitir la adhesión y proliferación celular sobre su superficie (Rechichi *et al.* 2008, Guan *et al.* 2005). También se han realizado investigaciones acerca de la liberación controlada de fármacos en este tipo de polímeros anfifílicos (Liu *et al.* 2008, Wei *et al.* 2009a); en esencia, se emplean copolímeros en bloque del tipo PCL-PEO-PCL, y en forma de nano partículas, para el estudio en el tratamiento de tejidos cancerosos (Yadav *et al.* 2008, Feng *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2010, Shahin *et al.* 2010) y la administración de diferentes fármacos, como el Honokiol de uso antiinflamatorio y quimioterapéutico (Guan *et al.* 2005, Wei *et al.* 2009b), Nimodipine para tratar la alta presión sanguínea (Hu *et al.* 2003), o antígenos para la producción de anticuerpos (Zhou *et al.* 2003).

Enfocando el presente estudio en posibles materiales para la reparación del tejido óseo, un tipo de fármaco de especial interés corresponde a los compuestos denominados bisfosfonatos, los cuales están caracterizados por la presencia de enlaces Fósforo–Carbono–Fósforo, P–C–P, estables al calor y a la mayoría de agentes químicos, además de ser completamente resistentes a la hidrólisis enzimática. La mayoría de bisfosfonatos inhiben la formación y agregación de cristales de fosfato de calcio,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , y además disminuyen su disolución. Estos efectos son producto de la afinidad de estos compuestos hacia la superficie de los cristales de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , en este caso perteneciente a la HAp ósea, produciendo una disminución de la resorción del tejido óseo, acompañado por un balance positivo del calcio y un incremento del contenido mineral en el hueso. Varios bisfosfonatos, en especial el Risedronato de sodio, RSD, cuya estructura se aprecia en la Figura 2–1, inhiben la resorción local de tejido óseo y cartilaginoso, y ayudan a preservar la estructura de las articulaciones. Los bisfosfonatos se depositan donde el mineral óseo está expuesto a los fluidos tisulares, en especial donde el hueso es formado y resorbido (Rodan *et al.* 1996, Fleisch *et al.* 2002). Se ha reportado que el RSD disminuye significativamente las fracturas vertebrales y de cadera producidas por osteoporosis, siendo 5mg al día una dosis adecuada para mujeres con osteoporosis postmenopáusica (Brown *et al.* 2002, Papapoulos 2001). Sin embargo, la administración oral u intravenosa del RSD puede presentar desventajas, ya que sólo una pequeña parte llega al lugar que requiere tratamiento; por lo tanto, se requeriría una dosis mayor que puede

tener efectos sistémicos peligrosos, como lesiones gastrointestinales serias u osteonecrosis de la mandíbula (Abu-Id *et al.* 2008). Por estas razones, es necesario estudiar materiales capaces de liberar bisfosfonatos localmente para concentrar su acción y evitar efectos secundarios (Czuryszkiewicz *et al.* 2005).

**Figura 2–1. Estructura del Risedronato de Sodio Hemipentahidratado, RSD-HPH, y el Risedronato de Sodio Anhidro, RSD-Anh.**



La HAp es fundamental en la estructura del tejido óseo, ya que otorga rigidez y resistencia al permanecer entre las fibras de Colágeno. Es necesario distinguir la HAp ósea y la HAp cristalina o mineral, siendo esta última empleada como agente adsorbente del RSD. La HAp ósea es análoga a la HAp cristalina,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ; en el hueso, la HAp presenta deficiencias de calcio y de grupos hidroxilo, permitiendo a otros iones ocupar su lugar (Carbonato, Potasio, Fluoruro, Citrato, etc.). Los cristales de este mineral en el hueso son relativamente pequeños, cercano a  $9 \times 6 \times 2 \text{ nm}$  en el tejido recién formado y algo más grande en tejido más viejo. Este pequeño tamaño es lo que facilita la incorporación y adsorción de iones externos, y permite su fácil disolución en el medio ácido creado por los osteoclastos durante el proceso de remodelamiento (Boskey 2006, Gokhale *et al.* 2001).

Así, el tratamiento mediante RSD adsorbido en partículas de HAp, ha sido formulado como una alternativa novedosa en el tratamiento de la osteoporosis (Sahana *et al.* 2013), y hasta ahora se reporta como una referencia única para este tipo de aplicación del RSD en HAp. Sin embargo, no se han realizado estudios en que se evalúen tanto las capacidades regeneradoras como las de liberación de fármacos en un solo material.

El presente estudio evalúa la adsorción y liberación del RSD en HAp, sistema que a su vez se incorpora en los poliuretanos PCL/PEO-HMW, para posteriormente evaluar su comportamiento como sustrato en el cultivo de osteoblastos.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se utiliza Risedronato de Sodio Hemipentahidratado (RSD-HPH), con un 99,9% de pureza (USP Rockville MD) y protegido de la luz durante su almacenamiento y uso, ya que es susceptible a ser degradado (Aluoch *et al.* 2004). HAp grado reactivo (Sigma-Aldrich) y tamizada hasta tamaño inferior a  $53\mu\text{m}$ . Las demás sales utilizadas en la preparación de los medios, como la solución acuosa de Cloruro de Potasio (KCl) para el estudio de adsorción, y solución buffer de fosfato (PBS) (*Phosphate Buffer Solution*) se usan en grado reactivo.

### 2.2.1 Condiciones y seguimiento de la Polimerización

En una reacción de polimerización por pasos, como la llevada a cabo para sintetizar los poliuretanos del tipo PCL/PEO y PCL/PEO-HMW, dada la naturaleza bifuncional de los díoles PCLdiol y PEO4000, y el diisocianato HMDI, estos no solamente reaccionan entre sí, sino también reaccionan con los productos de mayor peso molecular; así, entre mayor longitud de cadena va adquiriendo el producto, menor la probabilidad de reaccionar entre sus grupos terminales y los reactantes originales (Vermette *et al.* 2001). Como consecuencia, una mayor concentración de HMDI en los reactantes, otorga mayor probabilidad a las largas cadenas ya formadas enlazarse entre sí y por tanto obtener un alto peso molecular, como en efecto sucede en el caso de los poliuretanos PCL/PEO-HMW en comparación con los poliuretanos PCL/PEO, y verificado según los resultados obtenidos.

El proceso de polimerización para la síntesis de poliuretanos se realiza de manera análoga a lo descrito en la sección 1.2.1 utilizando 13g de reactivos en 100mL de tolueno; el avance de la reacción se determina de igual forma que la descrita en la sección 1.2.2. La diferencia radica en el aumento del peso molecular y la disminución en la fracción de PEO en el copolímero final. Un mayor peso molecular del copolímero se obtiene con una mayor proporción de HMDI, que se calcula al utilizar la distribución molecular del PCLdiol y del PEO4000 a partir de los resultados de GPC según la Figura 1–15 y la Figura 1–16, en lugar de sus pesos moleculares promedio, y de



acuerdo las Ecuaciones (2-1). Los valores de las sumas se hallan a partir de las distribuciones de peso molecular de los macrómeros PCLdiol y PEO4000, y se representan en las Ecuaciones (2-2).

$$\begin{aligned} \text{Balance molar:} \quad & m_{PCL} \sum \frac{x_{PCLi}}{M_{PCLi}} + m_{PEO} \sum \frac{x_{PEOi}}{M_{PEOi}} = \frac{m_{HMDI}}{M_{HMDI}} \\ \text{Balance en masa:} \quad & m_{PCL} + m_{PEO} + m_{HMDI} = m_T \quad (2-1) \\ \text{Fracción en masa:} \quad & Y_{PCL} = \frac{m_{PCL}}{m_{PCL} + m_{PEO}} \end{aligned}$$

Donde:

$m_{PCL}$ ,  $m_{PEO}$ , y  $m_{HMDI}$ , peso utilizado de PCLdiol, PEO4000 y HMDI en la reacción.

$M_{PCLi}$ ,  $M_{PEOi}$ , son los pesos moleculares de las fracciones  $i$  de los respectivos macrómeros.

$x_{PCLi}$ ,  $x_{PEOi}$ , son las fracciones en los macrómeros con peso molecular  $M_{PCLi}$  y  $M_{PEOi}$  respectivamente

$Y_{PCL}$  es la fracción en peso de PCL, libre de isocianato en el copolímero

$M_{HMDI} = 168,19$  es el peso molecular del HMDI

$$\sum \frac{x_{PCLi}}{M_{PCLi}} = 0,000616737 \quad \sum \frac{x_{PEOi}}{M_{PEOi}} = 0,000254780 \quad (2-2)$$

Combinando las Ecuaciones (2-1) y (2-2), se hallan las cantidades de cada macrómero y del HMDI en función de la fracción de la PCL,  $Y_{PCL}$ , y la masa total del copolímero,  $m_T$ , obteniendo las Ecuaciones (2-3):

$$\begin{aligned} m_{PCL} &= \frac{\frac{1}{M_{HMDI}} \cdot Y_{PCL} \cdot m_T}{\frac{1}{M_{HMDI}} + Y_{PCL} \sum \frac{x_{PCLi}}{M_{PCLi}} + (1 - Y_{PCL}) \sum \frac{x_{PEOi}}{M_{PEOi}}} \\ m_{PEO} &= \frac{\frac{1}{M_{HMDI}} \cdot (1 - Y_{PCL}) \cdot m_T}{\frac{1}{M_{HMDI}} + Y_{PCL} \sum \frac{x_{PCLi}}{M_{PCLi}} + (1 - Y_{PCL}) \sum \frac{x_{PEOi}}{M_{PEOi}}} \quad (2-3) \\ m_{HMDI} &= \frac{\left[ Y_{PCL} \sum \frac{x_{PCLi}}{M_{PCLi}} + (1 - Y_{PCL}) \sum \frac{x_{PEOi}}{M_{PEOi}} \right] \cdot m_T}{\frac{1}{M_{HMDI}} + Y_{PCL} \sum \frac{x_{PCLi}}{M_{PCLi}} + (1 - Y_{PCL}) \sum \frac{x_{PEOi}}{M_{PEOi}}} \end{aligned}$$

Así, para obtener  $m_T=13g$  de copolímero y una determinada  $Y_{PCL}$  se hallan las cantidades necesarias para la polimerización como se muestra en la Tabla 2–1.

**Tabla 2–1. Cantidades utilizadas de los reactivos, calculadas a partir de la distribución molecular de los macrómeros, en la obtención de poliuretanos PCL/PEO-HMW.**

PCL/PEO-HMW (mol/mol)	PCL (%w)	$m_{HMDI}$ (g)	$m_{PCL}$ (g)	$m_{PEO}$ (g)
100/0-HMW	100,0	1,222	11,778	0,000
99,5/0,5-HMW	99,0	1,215	11,667	0,118
97/3-HMW	94,2	1,184	11,128	0,688
90/10-HMW	81,8	1,102	9,734	2,163
0/100-HMW	0,0	0,534	0,000	12,466

De acuerdo a los resultados de la Tabla 2–1, y comparados con los correspondientes de los poliuretanos PCL/PEO de la Tabla 1–1, es posible determinar que la cantidad de HMDI aumenta en mayor medida para el poliuretano de PCL (pasando de 7,7%w al 9,4%w), que para el poliuretano de PEO (cambio de 4,01%w al 4,11%w).

### 2.2.2 Caracterización de los poliuretanos PCL/PEO-HMW

Las técnicas de GPC, DSC, DMA, Ensayos de Tensión y Absorción de Agua utilizadas en la caracterización de los poliuretanos PCL/PEO-HMW siguen los mismos procedimientos y condiciones que las descritas en la sección 1.2. La distribución de peso molecular se midió únicamente para los poliuretanos de PCL 100/0-HMW y de PEO 0/100-HMW con el fin de ser comparados con los correspondientes poliuretanos de PCL 100/0 y de PEO 0/100 descritos en la sección 1.

### 2.2.3 Adsorción de Risedronato de Sodio en Hidroxiapatita

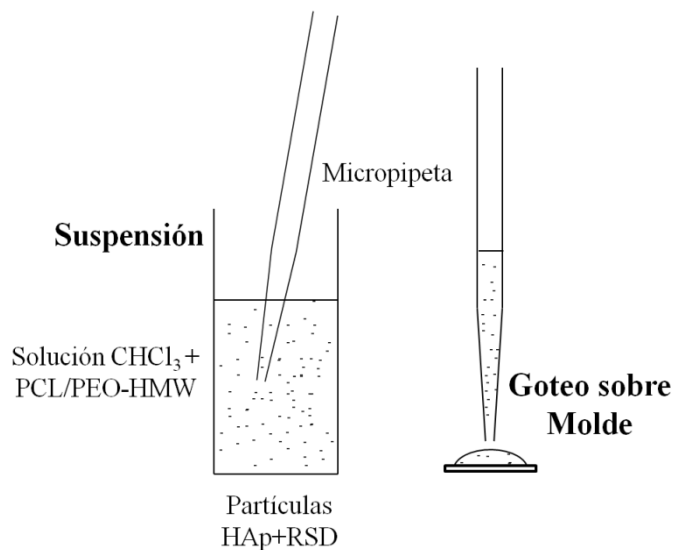
Para la adsorción del RSD en HAp se adapta el método descrito por Al-Kattan y colaboradores (Al-Kattan *et al.* 2010) y se realiza protegiendo el RSD de la luz en cada instante del procedimiento. Se disuelven 8mg de RSD-HPH en 8mL de solución de KCl 1mM y se calienta hasta 37°C. A continuación se introducen 80mg de HAp en la solución, para que el RSD sea adsorbido manteniendo la temperatura constante durante 3h. Se toman muestras de 30µL y completan hasta 2mL con agua destilada, para ser luego analizadas mediante HPLC. Una vez cumplidas las 3h, se procede a la separación de la HAp mediante centrifugación, el líquido se

descarta y la HAp con el RSD adsorbido, conjunto denominado HAp+RSD, se somete a secado al vacío a temperatura ambiente hasta alcanzar peso constante, obteniendo partículas finas que se almacenan protegidas de la luz.

#### 2.2.4 Liberación de Risedronato de Sodio en PBS.

Las muestras que incluyen HAp+RSD y PCL/PEO-HMW, se preparan con una solución de PCL/PEO-HMW en cloroformo 5% w/v (75mg de PCL/PEO-HMW en 1,5mL de cloroformo). Una vez alcanzada total disolución, se adicionan 15mg de HAp+RSD, equivalente al 20% w/w de HAp respecto al polímero, se suspende y homogeniza mediante agitación manual inmediatamente antes de ser goteadas sobre un molde de teflón de 10mm de diámetro. Se realizan 3 adiciones de 80 $\mu$ L de esta suspensión sobre el mismo molde, y asegurando que el solvente se haya evaporado antes de la segunda y tercera adición, obteniendo una muestra aproximadamente circular de un peso cercano a 10mg. Todo el proceso se realiza protegiendo las muestras de la luz. El proceso se puede observarse en la Figura 2-2.

**Figura 2-2. Preparación de las muestras para la liberación de RSD, a partir de una suspensión de HAp+RSD en solución de PCL/PEO-HMW en cloroformo.**



Las muestras de poliuretano PCL/PEO-HMW con HAp+RSD incorporada, fueron sumergidas en 1,5mL de PBS a 37°C durante 24h con el objeto de estudiar la liberación del RSD. En tiempos definidos se tomaron 50 $\mu$ L del líquido, para luego completar a 500 $\mu$ L con agua destilada para su

posterior análisis mediante HPLC. El PBS fue preparado en concentración 1x acorde con la información de la Tabla 2-2.

**Tabla 2-2. Composición de PBS en concentración 1x para 50mL de solución.**

Sal	Cantidad (mg)
KCl	2,5
NaCl	400,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	57,0

### 2.2.5 Concentración del Risedronato de Sodio mediante HPLC.

Las muestras de las soluciones de adsorción y liberación fueron analizadas mediante cromatografía líquida, procedimiento adaptado de (Aluoch *et al.* 2004, Jia *et al.* 2006); se utilizó un cromatógrafo equipado con bomba binaria HPLC Waters 1525, adaptado con una columna XBridge Shield RP18 5 $\mu$ m, 4,6 $\times$ 150mm y diámetro interno de 2,5mm, empleando un detector UV Waters 2489 a una longitud de onda de 262nm. Como fase móvil se empleó una mezcla de solución buffer de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM a pH 6,8 y metanol en un flujo de 1mL/min con relación Buffer/Metanol de 88/12 v/v. El cromatograma característico del RSD puede verse en la Figura 2-3, pero un pico plenamente definido no es obtenido, ya que no parte de la línea base; así, con el objeto de limitar el área del pico que se forma en aproximadamente 1,6min, se le realiza un ajuste a la suma de tres funciones del tipo distribución normal mediante mínimos cuadrados, representadas en la Figura 2-4 y según la Ecuación (2-4).

**Figura 2-3. Cromatograma de HPLC típico del RSD**

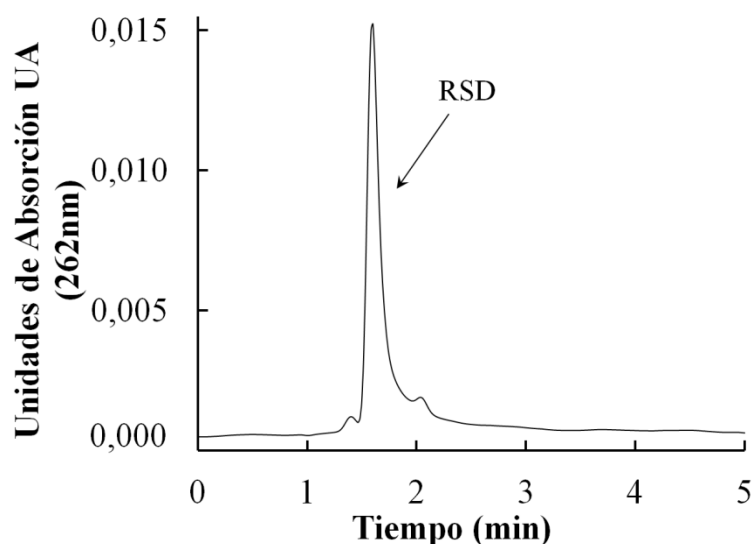
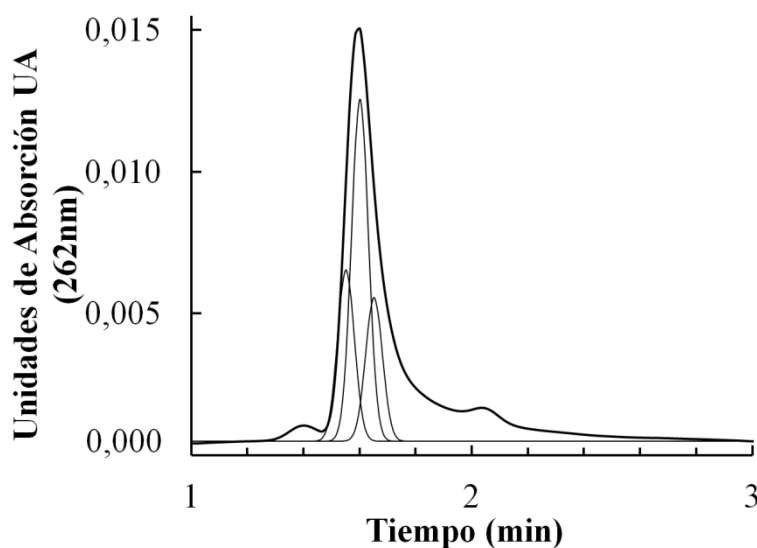


Figura 2-4. Ajuste del pico correspondiente al RSD utilizando funciones de distribución normal.



$$A(t) = \frac{A_1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{t-\mu_1}{\sigma}\right)^2} + \frac{A_2}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{t-\mu_2}{\sigma}\right)^2} + \frac{A_3}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{t-\mu_3}{\sigma}\right)^2} \quad (2-4)$$

Donde:

$t$ : Tiempo en minutos

$A$ : Señal de absorción.

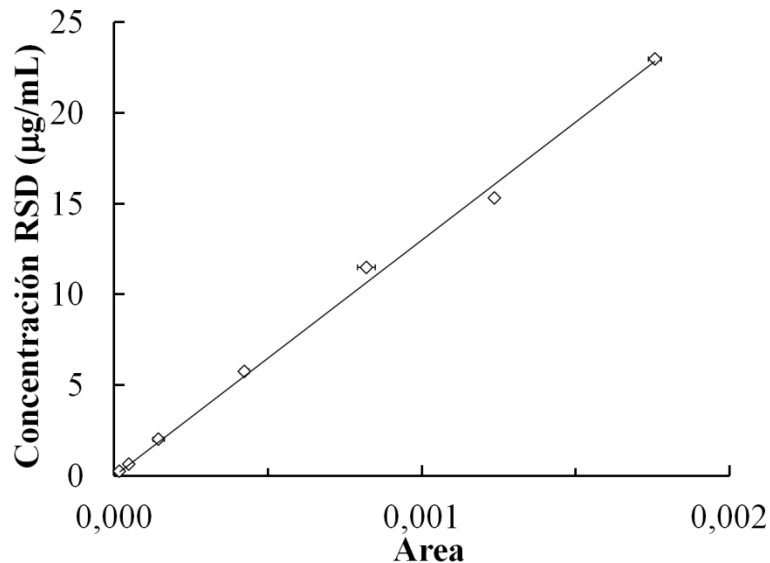
$A_n$ : Variables para el ajuste de mínimos cuadrados.

$\sigma$ : Desviación estándar de la función normal,  $\sigma=0,03$ , igual en las tres funciones

$\mu$ : Valores medios, constantes  $\mu_1=1,55min$ ;  $\mu_2=1,60min$ ;  $\mu_3=1,65min$

En la Figura 2-5 se presenta una curva de calibración construida a partir de soluciones patrón de concentración conocida. Los valores fueron corregidos pues el fármaco se pesa como RSD-HPH de peso molecular 350g/mol, mientras la concentración corresponde al RSD-Anh de peso molecular 305g/mol.

Figura 2–5. Curva de Calibración de HPLC de la concentración del RSD-Anh



### 2.2.6 Cultivos Celulares

Las muestras para el cultivo celular se preparan solubilizando los poliuretanos PCL/PEO-HMW al 1% *w/v*. Una vez alcanzada la total disolución, se divide en tres soluciones para producir tres clases de mezclas, con su respectiva identificación, ID:

Mezcla 1: No sufre modificaciones; ID: **PCL/PEO-HMW**

Mezcla 2: Se adicionan partículas puras de HAp; ID: **PCL/PEO-HMW-HAp**

Mezcla 3: Se adicionan partículas de HAp+RSD; ID: **PCL/PEO-HMW-HAp+RSD**.

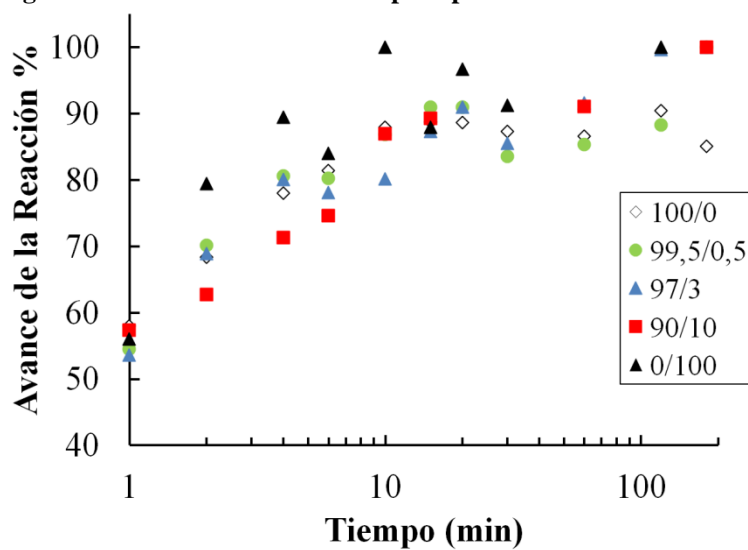
En las mezclas 2 y 3 el contenido de HAp es 20% *w/w* respecto al polímero. HAp+RSD se prepara de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 2.2.3.

Inmediatamente antes de ser goteada sobre un cubreobjeto de vidrio de 12mm, la mezcla se suspende y homogeniza mediante agitación manual. Se realiza una adición de 80µL, y una vez el solvente se ha evaporado en condiciones ambientales se somete a 2h al vacío para asegurar la eliminación total del cloroformo. Sin ser retiradas de los cubreobjetos de vidrio, las muestras se almacenan protegidas de la luz y en recipientes con desecante, hasta ser utilizadas en el respectivo cultivo. La preparación de los medios de cultivo, siembra de los osteoblastos y sus métodos de evaluación se describen en el Anexo A.

## 2.3 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 2.3.1 Avance de la Reacción

Figura 2-6. Avance de la reacción para poliuretanos PCL/PEO-HMW



En la Figura 2-6 se observa la evolución de la reacción de polimerización de los poliuretanos PCL/PEO-HMW. Es evidente la dispersión de los puntos experimentales haciendo difícil la identificación de una tendencia, en especial para el poliuretano de PEO 0/100-HMW; esta dispersión puede atribuirse al aumento de la viscosidad de la mezcla reactiva, más prominente que la correspondiente al poliuretano de PEO 0/100, teniendo en cuenta el aumento de HMDI utilizado en la reacción (Ver discusión de las causas de error del método de titulación inversa en la sección 1.3.1). Las curvas correspondientes a las composiciones ricas en PCL, desde el poliuretano de PCL 100/0-HMW hasta PCL/PEO-HMW=90/10-HMW, presentan un comportamiento similar entre sí, alcanzando un avance entre 85 y 90%; la curva correspondiente al poliuretano de PEO 0/100-HMW parece obtener un mayor avance de reacción en menor tiempo, alcanzando entre 90 y 95%.

### 2.3.2 Distribución de Peso Molecular

El mayor peso molecular obtenido por parte del poliuretano de PEO 0/100-HMW comparado con el peso molecular del poliuretano de PCL 100/0-HMW, según se observa en la Tabla 2-3, corresponde con un avance de reacción superior para los polímeros de PEO. El poliuretano de PCL

100/0-HMW registra un mayor peso molecular que lo obtenido en el poliuretano de PCL 100/0 y todavía presenta fracciones correspondientes al macrómero PCLdiol, según se aprecia en la Figura 2-7; de otro lado, el poliuretano de PEO 0/100-HMW no registra cadenas correspondientes al macrómero PEO4000 según la Figura 2-8, y presenta un peso molecular mayor que el correspondiente al poliuretano de PEO 0/100; esto se atribuye al menor aumento del contenido de HMDI (cambio de 4,04%w al 4,11%w de HMDI) que produce pocos grupos y terminaciones de cadena capaces de reaccionar, formándose solamente cadenas de alto peso molecular.

**Tabla 2-3. Peso molecular promedio para poliuretanos PCL/PEO y PCL/PEO-HMW**

Macrómero o Polímero	$\bar{M}_w$	$\bar{M}_n$	Índice de Polidispersidad
PCLdiol	2.947	1.621	1,8
100/0	59.344	26.953	1,9
100/0-HMW	112.093	46.688	2,4
PEO4000	4.217	3.926	1,1
0/100	42.966	19.915	2,2
0/100-HMW	187.060	103.801	1,8

**Figura 2-7. Distribución de peso molecular de los poliuretanos de PCL 100/0 y 100/0-HMW**

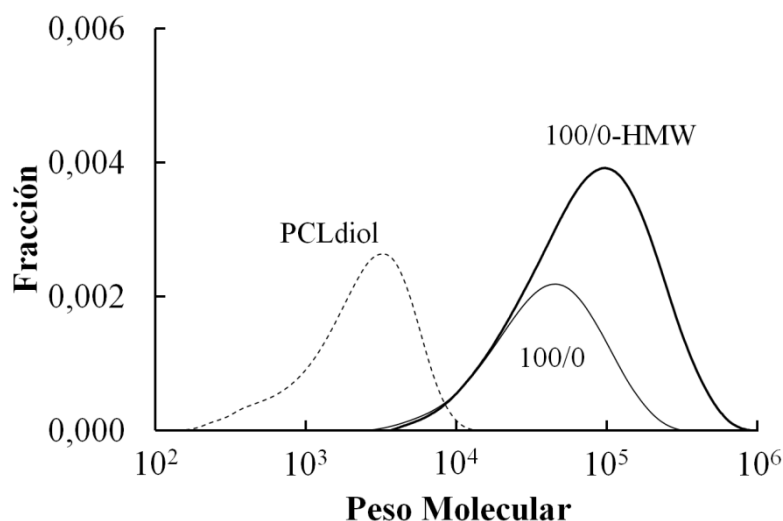
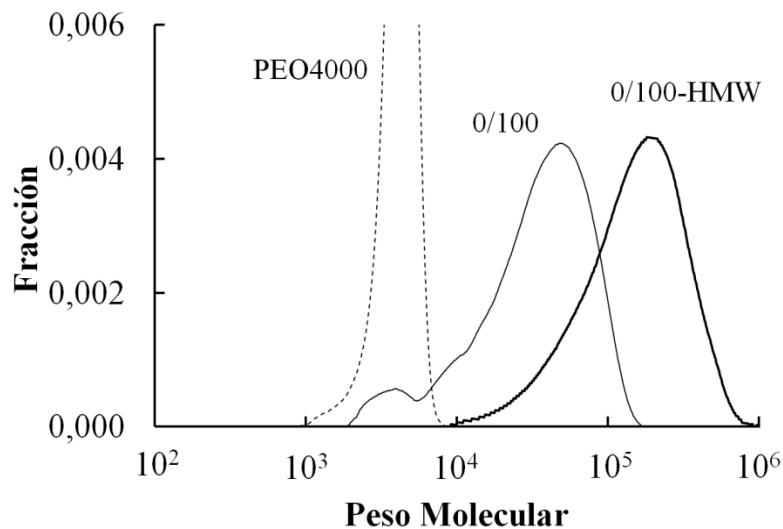




Figura 2–8. Distribución de peso molecular de los poliuretanos de PEO 100/0 y 0/100-HMW



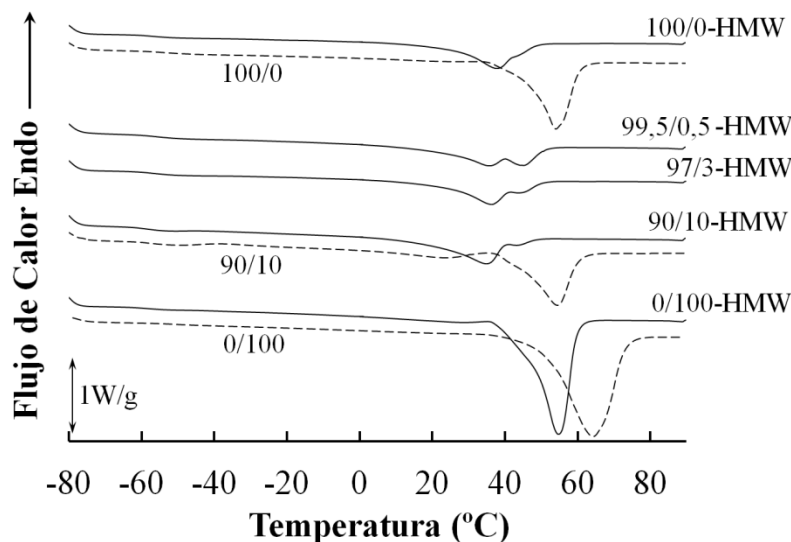
### 2.3.3 Fase amorfa y fase cristalina

Se evidencia una disminución de las temperaturas de fusión,  $T_m$ , y de transición vítrea,  $T_g$ , para los poliuretanos PCL/PEO-HMW respecto a aquellas correspondientes a los poliuretanos PCL/PEO, como puede observarse en la Tabla 2–4, que resume los datos obtenidos del primer calentamiento según la Figura 2–9. También es evidente una menor temperatura de cristalización, cerca de  $0^\circ\text{C}$  en contenido mayoritario de PCL, y  $30^\circ\text{C}$  en el poliuretano de PEO 0/100-HMW como puede observarse en la Figura 2–10.

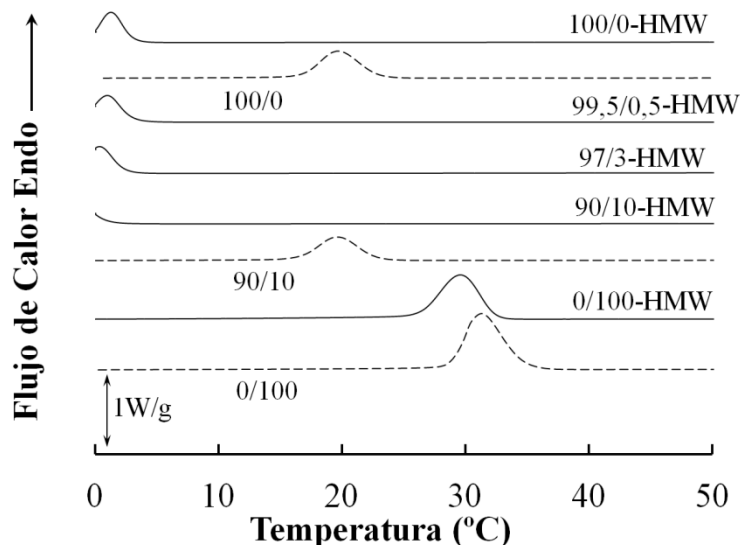
Tabla 2–4. Propiedades térmicas de los poliuretanos PCL/PEO-HMW comparados con los poliuretanos PCL/PEO, medidos en el primer calentamiento.

PCL (% mol)	PCL (% w)	PCL/PEO-HMW				PCL/PEO			
		$T_g$ ( $^\circ\text{C}$ )	$T_m$ ( $^\circ\text{C}$ )	$\Delta H$ (J/g)	%Cristal	$T_g$ ( $^\circ\text{C}$ )	$T_m$ ( $^\circ\text{C}$ )	$\Delta H$ (J/g)	%Cristal
100,0	100,0	-56,1	37,8	37,8	27,7	-53,2	45,5	65,9	48,4
99,5	99,0	-54,9	35,8	41,7	--	--	--	--	--
97,0	94,2	-55,9	36,4	38,7	--	--	--	--	--
90,0	81,8	-58,3	35,0	41,7	--	-54,4	42,2	61,8	--
0,0	0,0	-58,1	55,0	112,1	56,1	-50,9	50,8	128,5	64,3

**Figura 2-9. Termogramas de DSC, primer calentamiento para los poliuretanos de PCL/PEO-HMW, comparados con los poliuretanos PCL/PEO**



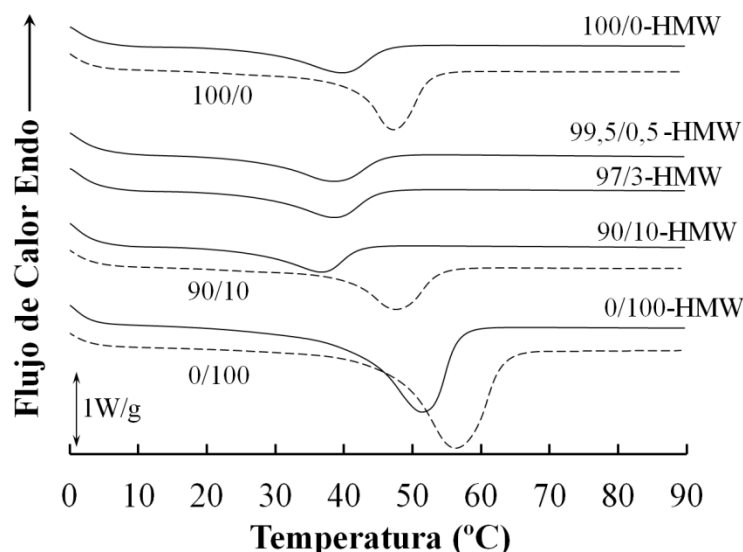
**Figura 2-10. Termogramas de DSC, enfriamiento después de borrar la historia térmica, para poliuretanos PCL/PEO-HMW, comparados con poliuretanos PCL/PEO**



La disminución del valor de  $T_m$  se atribuye a la presencia de cristales de menor tamaño, dado el alto peso molecular de los poliuretanos, ya que los segmentos de PEO y PCL poseen menor movilidad debido a su inclusión dentro de cadenas de gran longitud, impidiendo su organización en lamelas. Esto se asocia a la viscosidad del polímero, la cual aumenta con un mayor del peso molecular, tanto en solución como en el estado fundido. Así, cuanto más viscoso es el medio hay mayor dificultad de difusión de las cadenas para incorporarse a los cristales en crecimiento. Esto es

válido tanto en el primer calentamiento (muestras cristalizadas a partir la evaporación del solvente de su disolución) y en el segundo calentamiento (muestras cristalizadas a partir del estado fundido). Estas limitaciones en la formación de cristales, también explican el menor grado de cristalinidad obtenido, siendo evidente en el tamaño de los picos de fusión y a su vez en menores valores del calor de fusión,  $\Delta H$ , en igual situación durante el segundo calentamiento según la Figura 2–11.

**Figura 2–11. Termograma de DSC, segundo calentamiento para poliuretanos PCL/PEO-HMW comparados con poliuretanos PCL/PEO**



Se observan picos dobles de fusión durante el primer calentamiento, donde las muestras se fabrican a partir de la evaporación de solvente; al igual que los poliuretanos PCL/PEO, esto puede explicarse por la presencia de lamelas de PEO dentro de una fase mayoritaria de PCL, que también ha formado sus propias lamelas; la formación de estas lamelas se lleva a cabo después de la evaporación del solvente pero no de manera simultánea; es de aclarar que a partir de estos termogramas no es posible asegurar que cada pico corresponda a uno u otro componente. El desdoblamiento del pico de cristalización no se aprecia durante el segundo calentamiento, en que las muestras han sido fundidas y posteriormente enfriadas, lo que apunta a una cristalización simultánea de cada componente en fases separadas durante el enfriamiento, procesos que no influyen entre sí.

En los poliuretanos PCL/PEO-HMW, al igual que en los poliuretanos PCL/PEO, existe influencia mutua entre los segmentos de PCL y PEO en el momento de la cristalización, principalmente en cantidades comparables de cada componente (Nojima *et al.* 1992). Esta influencia causaría que el tamaño de la lamela cristalina sea menor y así reflejado en menores valores de  $T_m$  respecto a los poliuretanos de PCL 100/0-HMW y de PEO 0/100-HMW.

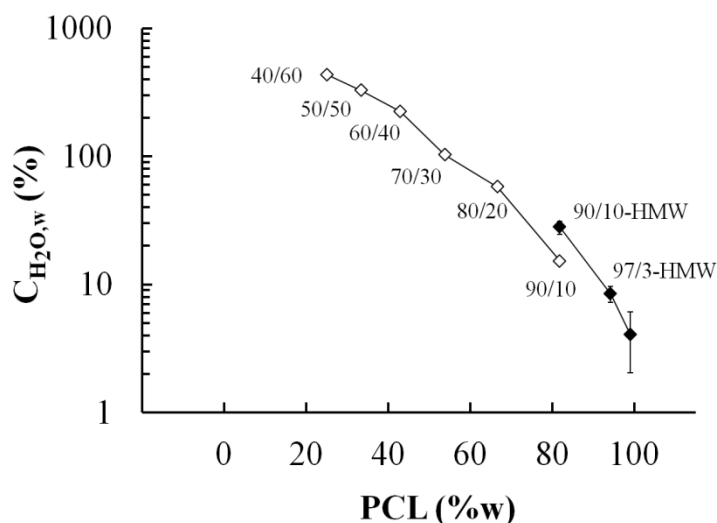
El aumento en el peso molecular de un polímero implica una mayor longitud de cadena y por tanto un mayor impedimento para su organización, lo que se traduciría en un aumento de  $T_g$ . Sin embargo, el mayor peso molecular de los poliuretanos PCL/PEO-HMW en comparación con los poliuretanos PCL/PEO produce el efecto contrario, según se reporta en la Tabla 2–4. Esto se puede explicar por el menor grado de cristalinidad de los poliuretanos PCL/PEO-HMW, lo que adjudica a las cadenas en fase amorfa una mayor movilidad y por tanto una menor  $T_g$ .

### 2.3.4 Absorción de Agua

La Figura 2–12 representa la capacidad de absorción de agua de los poliuretanos PCL/PEO-HMW, sin incluir el poliuretano de PEO 0/100-HMW que se disuelve totalmente, ni el poliuretano de PCL 100/0-HMW en la que no fue detectada capacidad de absorción. Se utiliza una escala logarítmica para observar en mayor detalle las curvas.

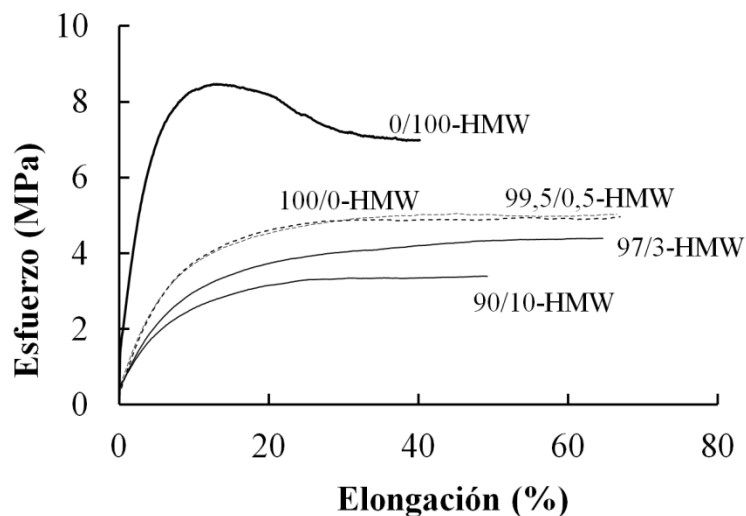
Con tan solo 1%w de PEO, los poliuretanos PCL/PEO-HMW adquieren aproximadamente un 4% de agua, aumentando con mayor contenido de PEO. Las únicas composiciones que pueden ser comparadas son PCL/PEO=90/10 y PCL/PEO-HMW=90/10-HMW, donde se observa una diferencia en la hidratación cercana a 15% en favor del poliuretano PCL/PEO-HMW=90/10-HMW. De igual manera, parece que la capacidad de absorción ha de ser superior para los poliuretanos PCL/PEO-HMW, aunque no es posible confirmarlo con los datos disponibles. Sin embargo, esta mayor capacidad de absorción podría explicarse mediante el grado de cristalinidad, que es menor para estos polímeros de alto peso molecular; es decir, poseen mayor cantidad de fase amorfa que es más susceptible de ser hidratada que la fase cristalina. En la descripción de la degradación hidrolítica de este tipo de polímeros en solución acuosa, la fase amorfa se degrada preferentemente sobre la fase cristalina (Mondal *et al.* 2012), lo que se produce como consecuencia directa de una mayor absorción de agua por parte de la zona amorfa.

**Figura 2–12. Cantidad de agua absorbida por los poliuretanos. Comparación entre PCL/PEO y PCL/PEO-HMW**



### 2.3.5 Propiedades Mecánicas

**Figura 2–13. Curvas de Esfuerzo a partir de los ensayos de tensión para los poliuretanos PCL/PEO-HMW a temperatura ambiente**



Según se observa en la Figura 2–13, los poliuretanos PCL/PEO-HMW presentan menor rigidez que los poliuretanos PCL/PEO. Aumentando el contenido de PEO hasta 18%w (PCL/PEO-HMW=90/10-HMW), los poliuretanos soportan menores esfuerzos a la fractura que los poliuretanos de PCL 100/0-HMW y de PEO 0/100-HMW, lo que podría extenderse a las demás composiciones intermedias, no evaluadas en este estudio. Además, según los valores de la Tabla 2–

5, el poliuretano de PEO 0/100-HMW alcanza los mayores valores del módulo elástico,  $E$ , lo que concuerda con una naturaleza de mayor rigidez respecto a las demás composiciones. Por tanto, una mayor rigidez puede asociarse al grado de cristalinidad. Así, los poliuretanos PCL/PEO tienen mayor grado de cristalinidad, por tanto presentan mayor rigidez respecto a los poliuretanos PCL/PEO-HMW; de igual manera, a mayor contenido de PEO, mayor cristalinidad y a su vez mayor rigidez.

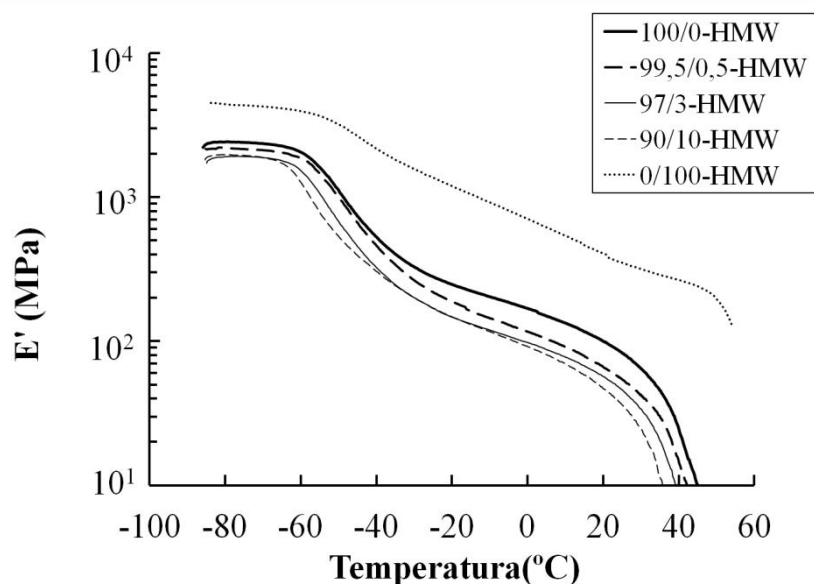
**Tabla 2–5. Propiedades mecánicas de los poliuretanos PCL/PEO-HMW a partir de las medidas de tensión a temperatura ambiente**

PCL/PEO (mol/mol)	E (MPa)	Fluencia		Fractura	
		Elongación (%)	Esfuerzo (MPa)	Elongación (%)	Esfuerzo (MPa)
100/0	53 ± 3	--	--	65 ± 1	4,8 ± 0,0
99,5/0,5	54 ± 2	--	--	58 ± 14	5,2 ± 0,1
97/3	36 ± 13	--	--	64 ± 1	4,2 ± 0,4
90/10	32 ± 2	--	--	45 ± 6	3,5 ± 0,2
0/100	141 ± 6	12 ± 1	8 ± 0,0	40 ± 0	7,0 ± 0,0

**Muestras dúctiles, es decir, la fractura ocurre después del punto de fluencia.**

El módulo de almacenamiento,  $E'$ , representado en la Figura 2–14, confirma la reducción de la rigidez en composiciones intermedias en los poliuretanos PCL/PEO-HMW, en comparación a los poliuretanos de PCL 100/0-HMW y de PEO 0/100-HMW, de manera similar al comportamiento observado para los poliuretanos PCL/PEO.

**Figura 2–14. Módulo de Almacenamiento,  $E'$ , para poliuretanos PCL/PEO-HMW**



Asignando la temperatura de relajación  $\alpha$ ,  $T_\alpha$ , al máximo valor del módulo de disipación,  $E''$ , que se representa en la Figura 2–15, de igual manera a lo hecho con los poliuretanos PCL/PEO, el comportamiento de  $T_\alpha$  también exhibe una reducción en composiciones intermedias respecto a los poliuretanos de PCL 100/0-HMW y de PEO 0/100-HMW, según se resume en la Tabla 2–6.

Figura 2–15. Módulo de Disipación,  $E''$ , para poliuretanos PCL/PEO-HMW

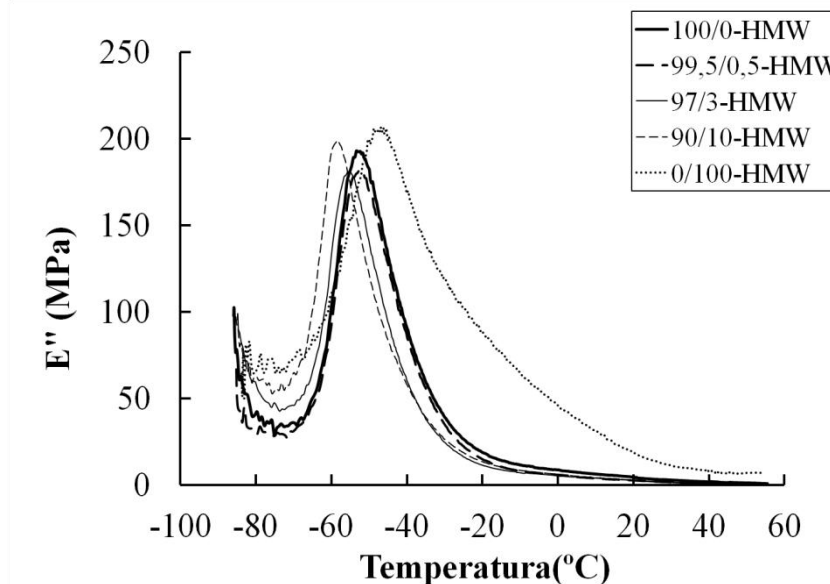


Tabla 2–6.  $T_g$  medido mediante DSC y  $T_\alpha$  medido mediante DMA, comparando los poliuretanos PCL/PEO-HMW y PCL/PEO

PCL (%mol)	PCL (%w)	PCL/PEO		PCL/PEO-HMW	
		$T_g$ (°C) DSC	$T_\alpha$ (°C) DMA	$T_g$ (°C) DSC	$T_\alpha$ (°C) DMA
100,0	100,0	-57,5	-50,0	-56,0	-47,1
99,5	99,0	--	--	-54,9	-46,3
97,0	94,2	--	--	-55,9	-51,9
90,0	81,8	--	--	--	-54,0
0,0	0,0	-51,0	-42,2	-58,1	-42,1

La presencia de una posible relajación adicional entre la temperatura de relajación  $\alpha$ ,  $T_\alpha$ , y la temperatura de fusión,  $T_m$ , puede ser considerada en el poliuretano de PEO 0/100-HMW según se aprecia en la Figura 2–16 y ampliada en la Figura 2–17, distorsión que se trató como una segunda transición vítrea en los poliuretanos de PCL/PEO con mayor contenido de PEO. De hecho, al

realizar la comparación del comportamiento de  $E'$  en la Figura 2-18 puede observarse que efectivamente ambos poliuretanos con 100% de PEO, describen un segundo punto de inflexión en  $20^{\circ}\text{C}$  aproximadamente, que podría ser asignado a una relajación entre  $T_{\alpha}$  y  $T_m$ .

Figura 2-16. Factor de pérdida,  $\text{Tan } \delta$ , para poliuretanos PCL/PEO-HMW.

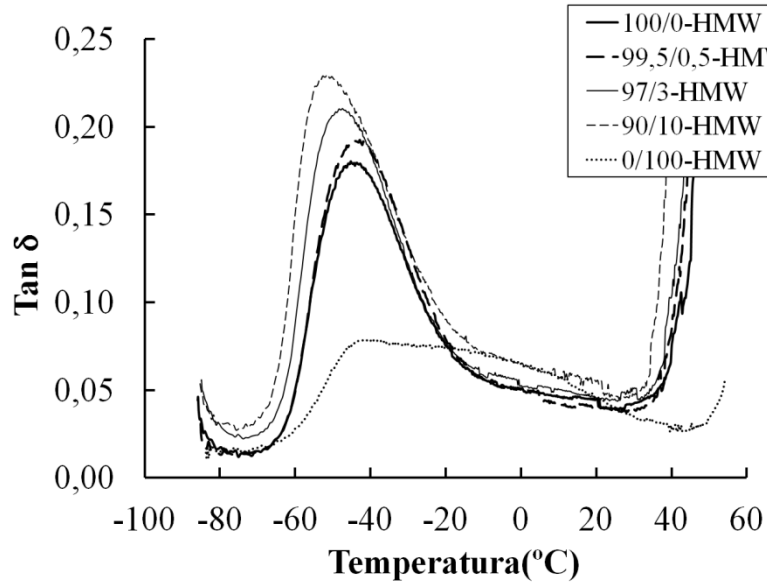
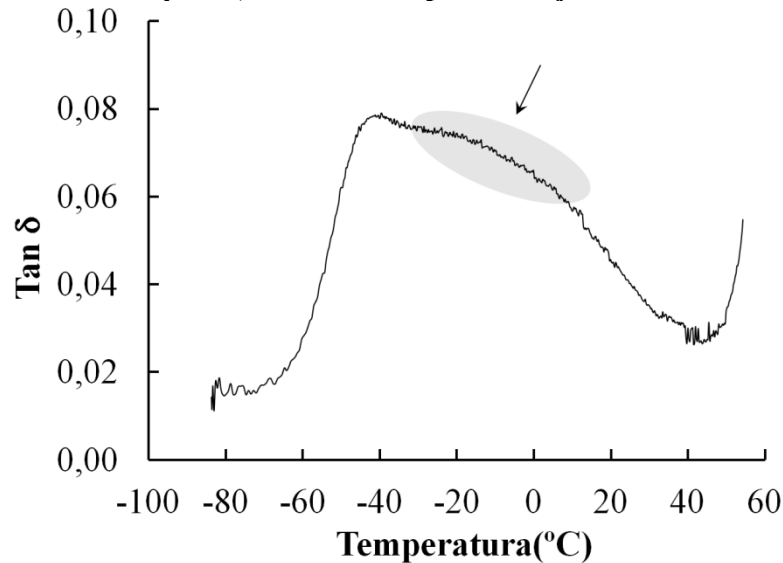
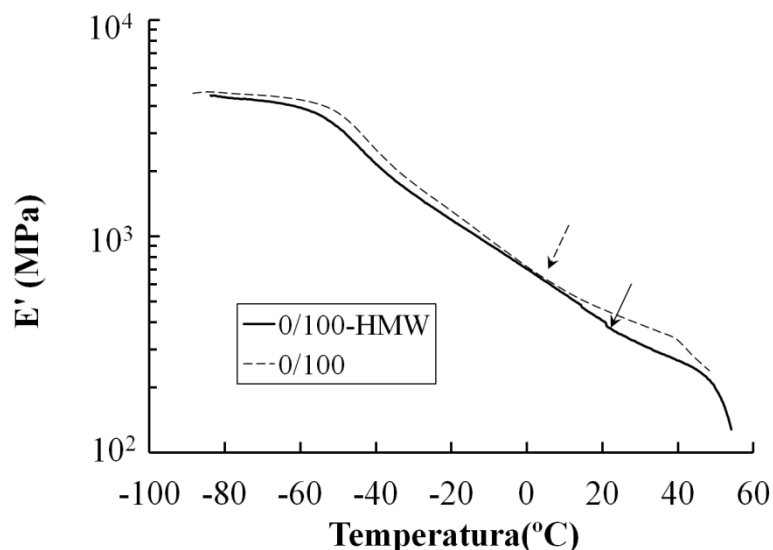


Figura 2-17. Factor de Pérdida,  $\text{Tan } \delta$ , para el poliuretano de PEO 0/100-HMW. Se indica la distorsión entre  $-30$  y  $20^{\circ}\text{C}$ , asociado a una posible relajación de cadena.





**Figura 2–18. Módulo de Almacenamiento,  $E'$ , comparando poliuretanos de PEO 0/100 y 0/100-HMW. Se señala un segundo punto de inflexión, asociado a una posible relajación de cadena.**

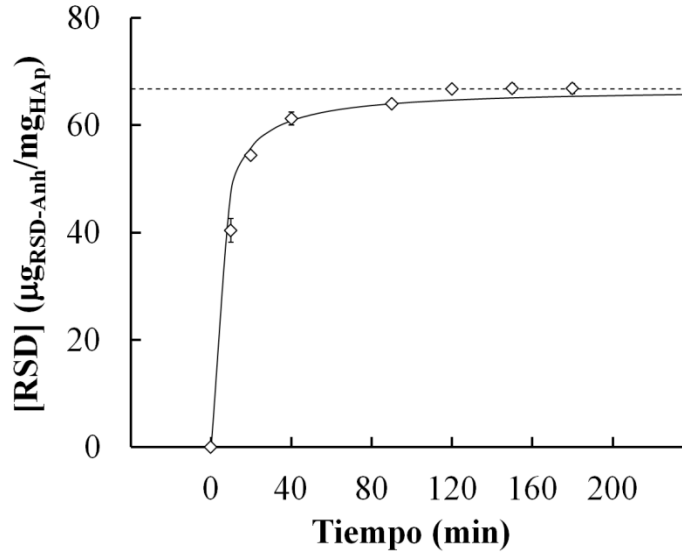


Una relajación intermedia entre  $T_\alpha$  y  $T_m$ , en efecto ha sido descrita en la literatura por R. F. Boyer en varias publicaciones, y cuyo trabajo ha sido resumido por D. W. Van Krevelen (Van Krevelen *et al.* 2009). Ellos describen que algunos polímeros semicristalinos revelan un pico en las curvas del módulo de disipación,  $E''$ , justo antes de  $T_m$ . La temperatura en que este pico presenta su valor máximo se denominó  $T_{\alpha c}$ , y se asocia a una rotación impedida de las cadenas de polímero dentro de los cristales plegados (Van Krevelen *et al.* 2009). Aunque en el caso de los poliuretanos de PEO 0/100 y 0/100-HMW, el pico asociado a esta relajación no es evidente en las curvas de  $E''$ , si podría asociarse a la distorsión presente entre  $T_\alpha$  y  $T_m$  en las correspondientes curvas de  $Tan\delta$ , aunque no hay elementos suficientes para concluir respecto a la naturaleza de esta posible relajación.

### 2.3.6 Adsorción y Liberación de Risedronato de Sodio.

El proceso de adsorción del RSD se representa en la Figura 2–19, la cual describe la concentración del RSD dentro de las partículas de HAp presente en las muestras, muestras inmersas en la solución de KCl y RSD durante la adsorción. Estos datos se obtienen a partir de las diferencias entre la concentración inicial en la solución y la concentración en cada tiempo en que se toma la respectiva muestra, y medidas mediante HPLC. Los datos obtenidos se ajustan a un modelo de seudo segundo orden, según la Ecuación (2–5), que de manera empírica ha podido ser ajustado a procesos de adsorción de un soluto sobre un adsorbente (Azizian 2004).

Figura 2–19. Concentración de RSD-Anh, [RSD], en las partículas de HAp durante el proceso de adsorción. Ajuste al modelo de pseudo-segundo orden



$$F = \frac{[RSD]}{[RSD_{\infty}]} \quad \frac{dF}{dt} = k \cdot (1 - F)^2 \quad (2-5)$$

Donde:

- [RSD] Concentración del RSD-Anh en HAp  
 [RSD<sub>∞</sub>] Concentración del RSD-Anh en el equilibrio. 66,9 µg<sub>RSD</sub>/mg<sub>HAp</sub>  
 k [min<sup>-1</sup>] Constante

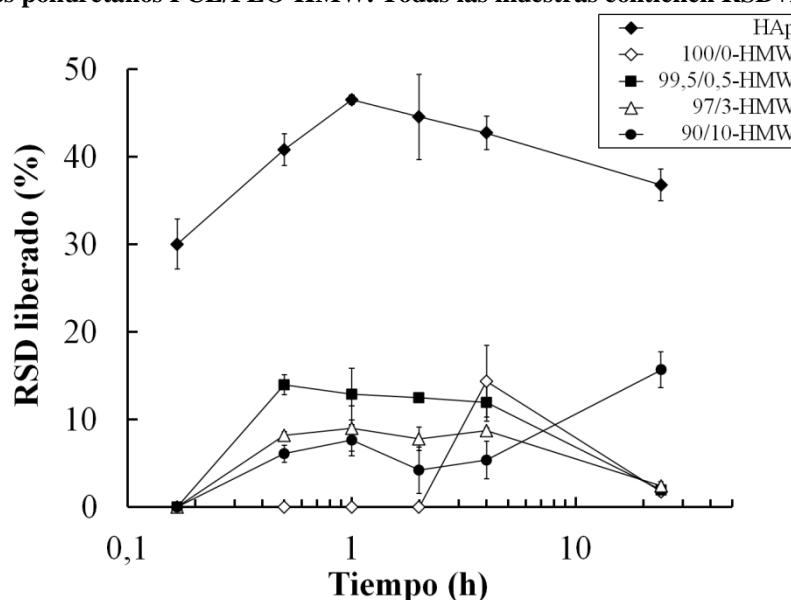
Al integrar la Ecuación (2–5) entre los límites  $F=0$  y  $F=F$ ,  $t=0$  y  $t=t$ , se obtiene la Ecuación (2–6). El valor de  $k$  hallado es  $0,256 \text{ min}^{-1}$  para la adsorción de RSD en HAp, asignando un valor de  $[RSD_{\infty}] = 66,9 \mu\text{g}_{\text{RSD}}/\text{mg}_{\text{HAp}}$ , aproximado al obtenido a las 3h de adsorción, donde al parecer se ha alcanzado el equilibrio.

$$[RSD] = \frac{k \cdot t}{1 + k \cdot t} \cdot [RSD_{\infty}] \quad (2-6)$$

La liberación del RSD, desde las muestras de poliuretano PCL/PEO-HMW con HAp+RSD incorporado, hacia la solución de PBS se representa en la Figura 2–20, donde se describe la concentración de RSD en la solución en que se introduce la muestra con el RSD previamente adsorbido. Los valores porcentuales son referidos a la máxima concentración posible en la solución

si todo el RSD presente en la HAp de la muestra se liberara, que corresponde a  $44,5 \frac{\mu g_{RSD}}{mg_{HAp} \cdot mL}$  y se aplica para todas las muestras. Se analizan también muestras de cantidades equivalente de HAp+RSD, para efectos de comparación con aquellas muestras en que HAp+RSD está incorporado en los poliuretanos PCL/PEO-HMW. Se puede observar un periodo inicial en que el RSD no es liberado durante los primeros  $10min$  en las muestras que contienen PEO. Este periodo es mayor para el poliuretano de PCL 100/0-HMW que dura hasta  $2h$ . Esto podría indicar que dado el carácter hidrofílico del PEO, el RSD se difunde a través del PEO hidratado desde las partículas de HAp hacia la solución de PBS, y en mayor proporción con mayor contenido de PEO. Esto no sucede con el poliuretano de PCL 100/0-HMW, pues siendo la PCL hidrofóbica no se hidrata y por tanto el RSD no puede pasar a través.

**Figura 2–20. Concentración de RSD en la solución de PBS durante el proceso de liberación de RSD desde los poliuretanos PCL/PEO-HMW. Todas las muestras contienen RSD+HAp.**



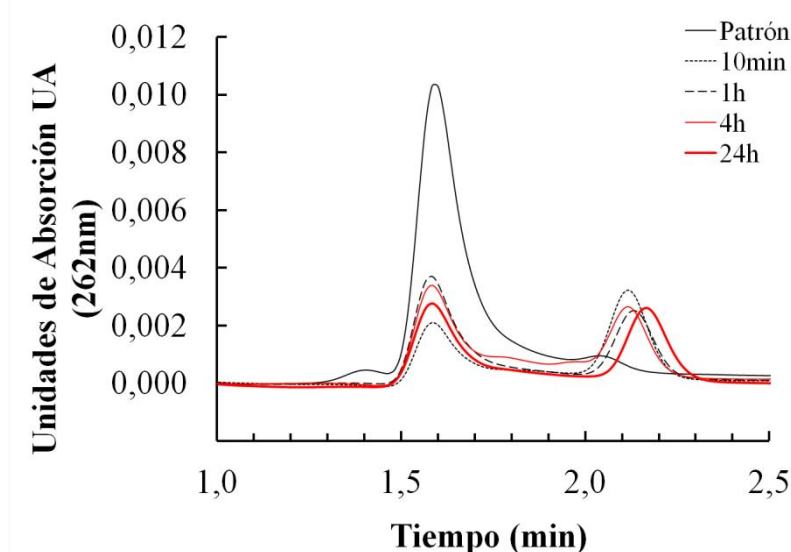
La liberación con mayor velocidad y concentración corresponde a la HAp, que durante  $1h$  alcanza un máximo correspondiente a 45% aproximadamente. Esto puede asociarse a una mayor superficie de contacto, pues no existe polímero que rodee las partículas, permitiendo una mejor difusión del RSD.

En la mayoría de muestras se manifiesta una disminución de la concentración de RSD en la solución, lo cual puede asociarse con la degradación del fármaco, que en efecto ha sido reportada en solución acuosa a  $70^{\circ}C$ . (Aluoch *et al.* 2004). Por el contrario, la composición PCL/PEO-

HMW=90/10-HMW muestra un aumento de la concentración de RSD en la solución durante todo el proceso de liberación, lo que podría atribuirse a una continua difusión del RSD a través de la matriz polimérica y hacia la solución, situación posible dado el alto contenido de PEO (10%mol), a una velocidad superior a la velocidad en que el RSD se degradaría en la solución.

Para verificar si existe degradación del RSD, se comparan los cromatogramas de liberación de las muestras de HAp+RSD sin incorporarse al poliuretano, con el correspondiente a una solución patrón, en los que puede apreciarse el pico principal en 1,6min asociado al RSD, según se puede observar en la Figura 2-21.

**Figura 2-21. Cromatogramas HPLC de liberación de RSD desde muestras de HAp+RSD. Se evidencia la degradación del RSD en solución por el cambio de posición del pico en aproximadamente 2,1min**

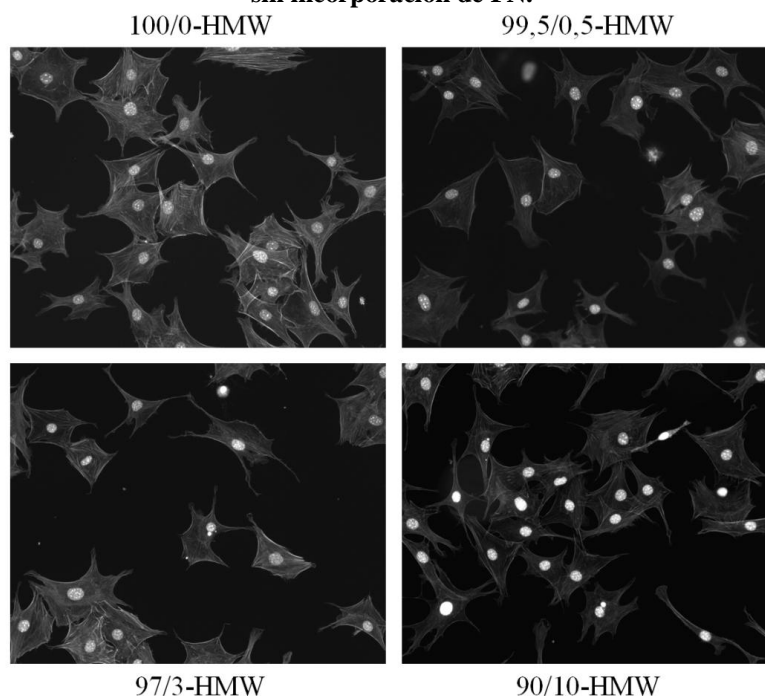


En los cromatogramas de liberación es evidente un pico adicional en aproximadamente 2,1min y que no está presente en la curva patrón; este pico parece desplazarse hacia tiempos más largos de detección y con mayor intensidad a medida que el tiempo de liberación aumenta, y a su vez el pico en 1,6min disminuye su intensidad. Estas observaciones pueden asociarse a la formación de productos de degradación que forman el pico en 2,1min, lo que se produce simultáneamente con la disminución del RSD en la solución, verificando por tanto la degradación del RSD en solución.

### 2.3.7 Comportamiento celular.

A pesar del menor contenido de PEO en los poliuretanos PCL/PEO-HMW en comparación con los poliuretanos PCL/PEO, las células sembradas sobre estos materiales no presentan buena adherencia; aunque la presencia de las células fue evidente durante el cultivo, las células se separan del material, debido a la tensión de cizalla que el líquido ejerce sobre ellas durante los cambios de medio, lavados y la fijación al cultivo final. Por tanto, se decide incorporar fibronectina (FN) a todas las muestras con o sin HAp, según procedimiento descrito en el Anexo A, con el fin de favorecer la adhesión celular. FN es una glicoproteína presente en la matriz extracelular, en el plasma y en otros fluidos corporales, y posee prominentes propiedades adhesivas hacia otras proteínas; entre sus funciones se destaca su participación en la migración celular durante la curación de heridas, así como la regulación del crecimiento y diferenciación celular (Ayad *et al.* 1998).

**Figura 2–22. Adhesión de osteoblastos 3h después de la siembra sobre muestras de PCL/PEO-HMW\* sin incorporación de FN.**



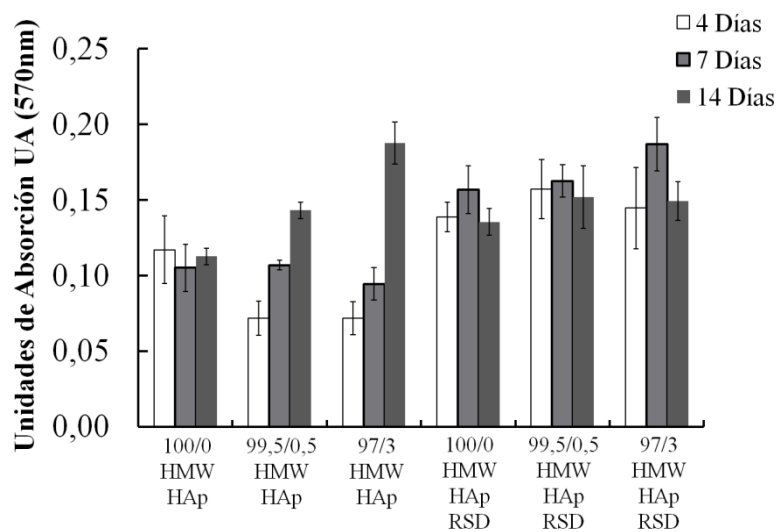
**\* Imagen tomada utilizando microscopio de fluorescencia. El núcleo celular y el citoesqueleto son teñidos con DAPI y *Phalloidin* respectivamente, según procedimiento descrito en el Anexo A.**

Según puede apreciarse en la Figura 2–22, las células se adhirieron y extienden sobre los poliuretanos PCL/PEO-HMW después de 3h en cultivo. No se observan células redondeadas o despegadas, como si era evidente sobre los poliuretanos PCL/PEO de menor peso molecular. No

fue posible seguir cultivando las muestras de PCL/PEO-HMW=90/10-HMW durante el periodo planteado porque las muestras se desprendían de su soporte de vidrio haciéndose inmanejables, debido al hinchamiento del PEO; este desprendimiento también sucedió en tiempos más largos para las muestras de PCL/PEO-HMW=99,5/9,5-HMW y PCL/PEO-HMW=97/3-HMW, pero en menor medida y sin comprometer la integridad de la muestra. Así, se descartan las muestras que contienen el poliuretano PCL/PEO-HMW=90/10-HMW para posteriores cultivos.

Se procedió entonces a la siembra sobre las muestras PCL/PEO-HMW-HAp y PCL/PEO-HMW-HAp+RSD, con el fin de evaluar el efecto del RSD en el comportamiento de los osteoblastos. En la Figura 2-23 se presentan los datos de absorbancia de las muestras de los cultivos después de aplicar el procedimiento colorimétrico utilizando *Alamar Blue*, según se describe en el Anexo A.

**Figura 2-23. Ensayo de *Alamar Blue*. Proliferación celular de osteoblastos sembrados sobre muestras basadas en poliuretanos PCL/PEO-HMW**

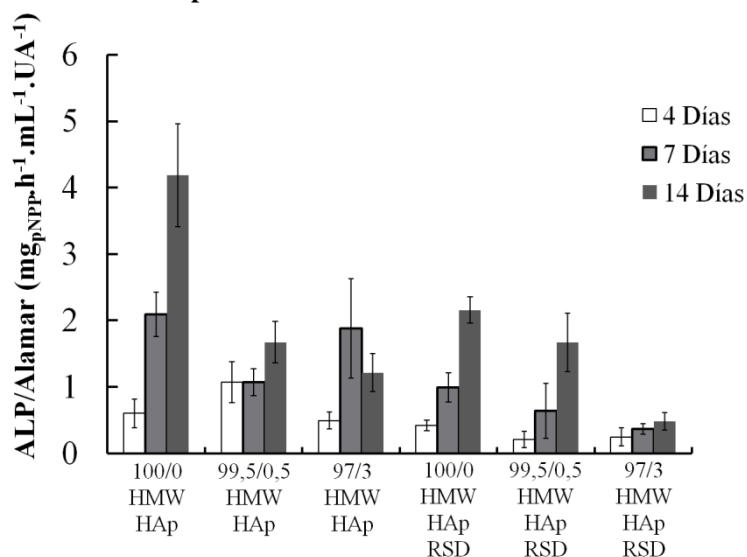


La absorbancia leída está relacionada con la actividad metabólica de los osteoblastos; entonces, considerando una actividad metabólica constante por célula, una creciente absorbancia se relaciona con una mayor población celular, es decir, las células proliferan. En las muestras del poliuretano de la PCL 100/0-HMW-HAp y 100/0-HMW-HAp+RSD, no hay una marcada evolución en la absorbancia; eso puede ser debido a que las células ya están en confluencia desde el primer tiempo de cultivo ensayado (4 días), por lo cual no se aprecia un cambio significativo; en efecto, es sabido que los osteoblastos presentan una curva de proliferación logarítmica hasta llegar a confluencia, donde la proliferación cesa y las células empiezan a diferenciarse, momento en que inician la

producción de la matriz extracelular y su mineralización (Lian *et al.* 1992). En las muestras PCL/PEO-HMW=99,5/0,5-HMW y PCL/PEO-HMW=97/3-HMW, la adhesión inicial es más limitada dada la presencia del PEO, pero de igual forma se presenta una marcada proliferación en los días siguientes. Las muestras con RSD no muestran cambios significativos en el metabolismo celular, lo que en principio indicaría que la presencia del RSD no representa una ventaja en la proliferación de los osteoblastos. Sin embargo, también puede apreciarse que los niveles de metabolismo son más altos en las muestras PCL/PEO-HMW-HAp+RSD respecto a las muestras sin RSD, y considerando que las densidades celulares no difieren en gran medida entre muestras, esto sí podría indicar que el metabolismo basal es favorecido por la presencia del RSD.

La actividad de la fosfatasa alcalina, ALP, que se relaciona directamente con la diferenciación celular, aumenta con el tiempo en la mayoría de muestras, tendencia que persiste una vez que se ha normalizado respecto a los datos de la actividad metabólica de las células (*Alamar Blue*), según se puede ver en la Figura 2–24.

**Figura 2–24. Actividad de ALP normalizada de osteoblastos sembrados sobre muestras basadas en poliuretanos PCL/PEO-HMW**

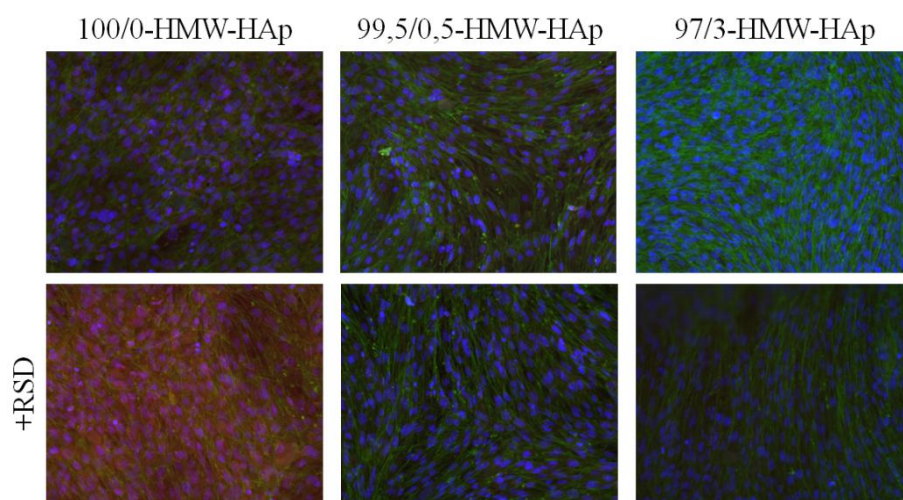


En general, los materiales más hidrofóbicos (mayor contenido de PCL) presentan mayor actividad de la alcalina fosfatasa respecto a los menos hidrofóbicos, y además, las muestras que poseen RSD no llegan a los mismos valores de la actividad de la ALP que las demás muestras. La baja diferenciación sobre las muestras que contienen PEO, en comparación con el poliuretano de PCL 100/0-HMW, puede explicarse precisamente por la presencia del PEO, el cual inhibe la adhesión

celular sobre la matriz polimérica y podría influenciar las funciones celulares a través de la modulación del citoesqueleto. A pesar de los bajos valores de la actividad de la ALP en las muestras que contienen RSD, se observa un aumento de la actividad en las muestras con menor contenido de PEO, lo que podría indicar que el risedronato incorporado a la HAp tiene un efecto ventajoso sobre la diferenciación osteoblástica.

En las fotografías de inmunofluorescencia de la Figura 2–25 y la Figura 2–26, realizadas a los 14 días de cultivo en medio de diferenciación, pueden apreciarse los núcleos celulares teñidos de azul; la actina que forma parte del citoesqueleto celular se visualiza en color verde; las zonas con tonos rojos muestran la presencia la matriz extracelular y secretada por los osteoblastos: colágeno u osteocalcina según el caso.

**Figura 2–25. Inmunofluorescencia Colágeno. Osteoblastos sembrados sobre muestras basadas en poliuretanos PCL/PEO-HMW y FN. Fotografías tomadas a los 14 días después de la siembra.**

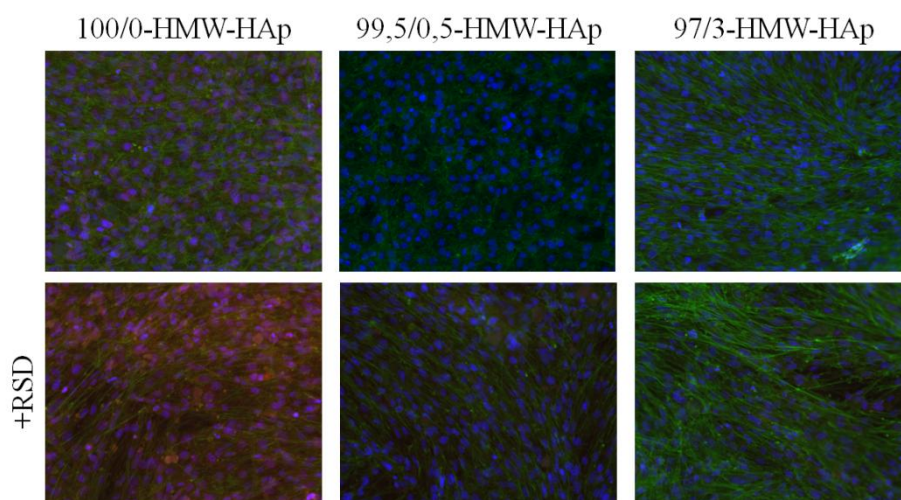


Todas las muestras sembradas con osteoblastos han demostrado su capacidad para permitir la adhesión de los osteoblastos, incluyendo las muestras con RSD. La síntesis de matriz extracelular es demostrada por la presencia del Colágeno y la Osteocalcina en todas las muestras. Las muestras hidrofílicas son las que menos se han teñido, a pesar de poseer densidades celulares similares a las muestras hidrofóbicas. En las muestras de PCL, se observa mayor tinción en la muestra de PCL 100/0-HMW-HAp+RSD respecto a la muestra de PCL 100/0-HMW-HAp, lo que apunta a un efecto ventajoso del RSD sobre la secreción de matriz extracelular. Así, la hidrofiliidad de la matriz polimérica parece inhibir la acción del RSD, a pesar de una mayor liberación hacia el medio de cultivo, como puede inferirse de la Figura 2–20. Sin embargo, es precisamente el retraso de la liberación del RSD en las muestras de PCL, el que permitiría al RSD permanecer dentro de la HAp



durante el lavado y el cambio de medio, procesos que habrían retirado de manera temprana el RSD de la HAp en las muestras hidrofílicas; por tanto, el RSD estará disponible en mayor proporción en las muestras 100/0-HMW-HAp+RSD respecto a las demás composiciones. Por otra parte, el efecto de la hidrofiliicidad de la matriz sobre la adhesión celular y la modulación del citoesqueleto podrían ser más determinantes que la presencia del RSD liberado en el cultivo, enmascarando la acción del fármaco en la actividad celular.

**Figura 2–26. Inmunofluorescencia Osteocalcina. Osteoblastos sembrados sobre muestras basadas en poliuretanos PCL/PEO-HMW y FN. Fotografías tomadas a los 14 días después de la siembra.**



El aumento aquí observado en la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, como consecuencia de la liberación del RSD desde la HAp incorporada en los poliuretanos PCL/PEO-HMW, es coincidente con lo reportado por varios autores, quienes describen a los bisfosfonatos no solo como agentes reductores de la acción de los osteoclastos en la resorción ósea, sino también como promotores de la diferenciación y maduración osteoblástica (Im *et al.* 2004, Jeong *et al.* 2013), y agentes capaces de prevenir la apoptosis, o muerte celular, de los osteoblastos y osteocitos (Bellido *et al.* 2011).



### **3. PARTE III. CARACTERIZACIÓN DE MEMBRANAS DE PLLA Y PCL DEGRADADAS**

En esta parte se describe la caracterización de membranas porosas de Poli (L Ácido Láctico) (PLLA) y Poli ( $\epsilon$ -Caprolactona) (PCL), después de ser degradadas hidrolíticamente. Estas membranas fueron fabricadas durante un trabajo previo realizado por Lebourg y colaboradores mediante *freeze extraction*, método utilizado para obtener materiales poliméricos porosos (Ma *et al.* 2003, Nam *et al.* 1999, Lebourg *et al.* 2008), y a continuación sometidas a degradación hidrolítica, también previamente al presente estudio. Estas membranas se nombran como PLLA/PCL w/w. Los procesos de fabricación y degradación de las membranas se describen en el Anexo B.

#### **3.1 ESTADO DEL ARTE**

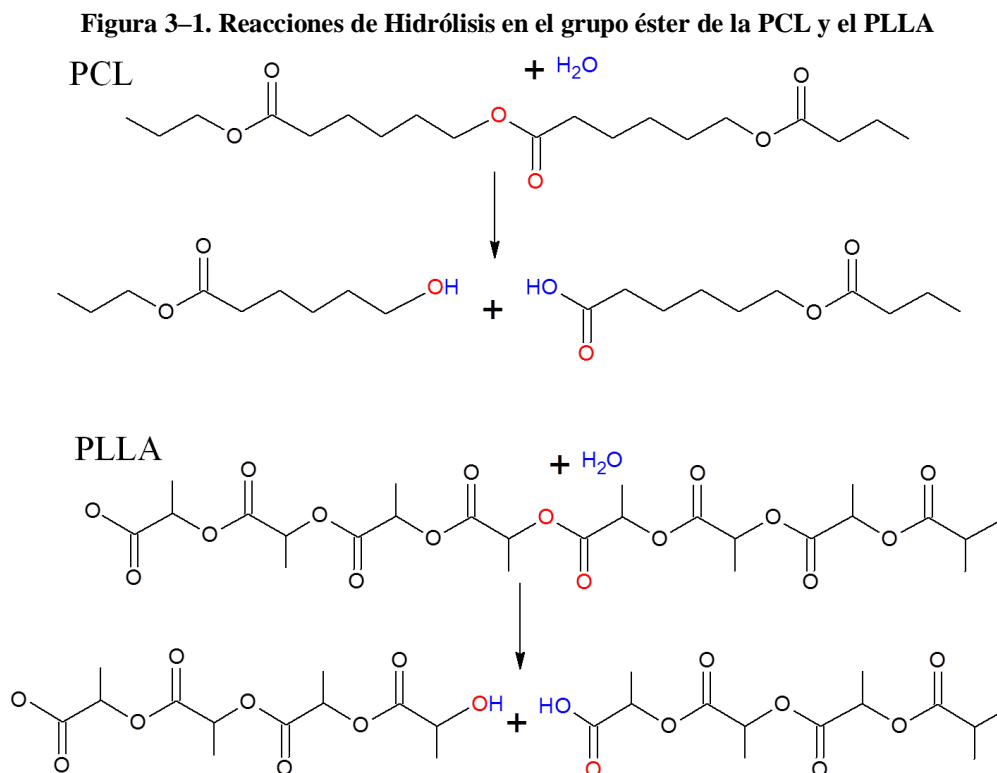
El PLLA y la PCL son poliésteres alifáticos ampliamente utilizados y aprobados para aplicaciones biomédicas (Nampoothiri *et al.* 2010). Estos polímeros y sus mezclas están en creciente uso en la ingeniería de tejidos debido a su capacidad de procesamiento y biocompatibilidad. El PLLA y la PCL pueden ser modificadas dentro de su matriz polimérica (Woodruff *et al.* 2010) o sobre su superficie (Rasal *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2009), buscando las condiciones adecuadas para adquirir un comportamiento celular hacia aplicaciones específicas (Reilly *et al.* 2010). La incorporación de la PCL ha demostrado aumentar la resistencia a la fractura y reducción de la fragilidad del PLLA (Todo *et al.* 2007), mientras que la incorporación del PLLA incrementa la velocidad de degradación de la PCL (Lebourg *et al.* 2008).

La velocidad de degradación y la evolución de las propiedades del material durante este proceso son de gran importancia dentro de la ingeniería de tejidos, ya que estos procesos influyen en la adhesión celular sobre el implante debido a los cambios en la química superficial, en la homeóstasis del medio debido a la liberación de productos de degradación (Martin *et al.* 1996) y en el ambiente biomecánico debido a la pérdida de propiedades mecánicas durante la degradación. Idealmente, la velocidad de degradación de un implante debería ser similar a la velocidad de

regeneración del tejido: que no se degrade muy rápido para mantener la integridad biomecánica de la zona de regeneración, ni tampoco muy lentamente, ya que entorpecería la regeneración y limitaría la respuesta de reparación del organismo receptor del implante.

La degradación hidrolítica *in vitro* de la PCL (Tsuji *et al.* 2005, Peña *et al.* 2006, Domingos *et al.* 2010, Bosworth *et al.* 2010, Liu 2010), el PLLA (Tsuji *et al.* 2008, Zhao 2008, Tsuji *et al.* 2010, Shi *et al.* 2011), y sus mezclas (Tsuji *et al.* 1998, Qian *et al.* 2000, Saha *et al.* 2006, Vieira *et al.* 2011) ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo no se ha realizado un estudio previo correspondiente a la degradación hidrolítica de este tipo de membranas. Por tanto, se hace necesario estudiar este fenómeno para las membranas de PLLA y PCL, y así obtener información acerca del posible comportamiento en estudios *in vivo*.

En el presente estudio, se describe la evolución de las propiedades de membranas compuestas por la mezcla de PLLA y PCL, producidas mediante la técnica de *freeze extraction* según el método reportado previamente por Lebourg y colaboradores (Lebourg *et al.* 2008), con posibles aplicaciones en ingeniería de tejidos. La reacción de hidrólisis responsable de la degradación en los poliésteres se representa para la PCL y el PLLA en la Figura 3–1.



## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se caracterizan las membranas porosas de PLLA y PCL previamente degradadas hidrolíticamente y que fueron conservadas en vasos secantes hasta el momento de su caracterización en el presente estudio. Con fines de comparación, también se estudian los pellets de PLLA y PCL de igual calidad que aquellos utilizados en la fabricación de las membranas, y degradados en iguales condiciones. Estos pellets son nombrados como PLLAB y PCLB.

### 3.2.1 Cromatografía líquida y Resonancia Magnética.

Con el objetivo de monitorear la evolución de la composición durante la degradación en PBS, fue utilizado un método indirecto para cuantificar el PLLA en las membranas degradadas, midiendo el ácido l-láctico asociado al PLLA mediante cromatografía líquida HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Primero, muestras de cada membrana, entre 5 y 10mg, fueron degradadas totalmente mediante hidrólisis alcalina, en 2mL de solución de NaOH 5N a 60°C y durante 48h, para así obtener el ácido l-láctico. Posteriormente el medio alcalino fue neutralizado con solución de HCl 0,25N y diluido en solución buffer de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM a pH 2.8. Alícuotas de estas soluciones fueron analizadas mediante cromatografía líquida utilizando un cromatógrafo equipado con una bomba binaria HPLC Waters 1525, adaptado con una columna XBridge C18, 4,6×150mm y diámetro interno de 2,5mm, empleando un detector UV Waters 2489 a 210nm. Como fase móvil se utilizó la misma solución buffer de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM a pH 2.8 con flujo de 1mL/min. La confiabilidad de los resultados obtenidos por HPLC fue evaluada comparando estos datos con aquellos obtenidos mediante <sup>1</sup>H NMR, técnica generalmente utilizada, con igual procedimiento al expuesto en la sección 1.2.3.

### 3.2.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Las medidas de DSC fueron llevadas a cabo en un Calorímetro Mettler Toledo 823e. El peso de las muestras estuvo entre 5-10mg. Se realizó un calentamiento inicial a 10°C/min desde 0 hasta 220°C. La muestra se mantuvo a 220°C durante 3 minutos y entonces fue enfriada hasta 0°C a 10°C/min. Un segundo calentamiento a 10°C/min fue llevado a cabo nuevamente hasta 220°C. La  $T_g$  es hallada como el punto medio del aumento del cambio del  $\Delta C_p$  en la transición vítrea, mientras que

la  $T_m$  es medida en el máximo del pico de fusión. Los grados de cristalinidad,  $X_{C,PLLA}$  y  $X_{C,PCL}$ , en las membranas fueron calculados utilizando los valores del calor de fusión para los cristales puros,  $\Delta H_{PLLA}^o=90.95\text{J/g}$  (Pyda *et al.* 2004) y  $\Delta H_{PCL}^o=136.1\text{J/g}$  (Yam *et al.* 1999), de acuerdo a las Ecuaciones (3-1):

$$X_{C,PLLA} = \frac{\Delta H_{PLLA}}{\Delta H_{PLLA}^o} \cdot 100 \quad X_{C,PCL} = \frac{\Delta H_{PCL}}{\Delta H_{PCL}^o} \cdot 100 \quad (3-1)$$

Donde  $\Delta H_{PLLA}$  y  $\Delta H_{PCL}$  son los calores de fusión calculados del área bajo la curva de los picos de fusión del PLLA y la PCL respectivamente.

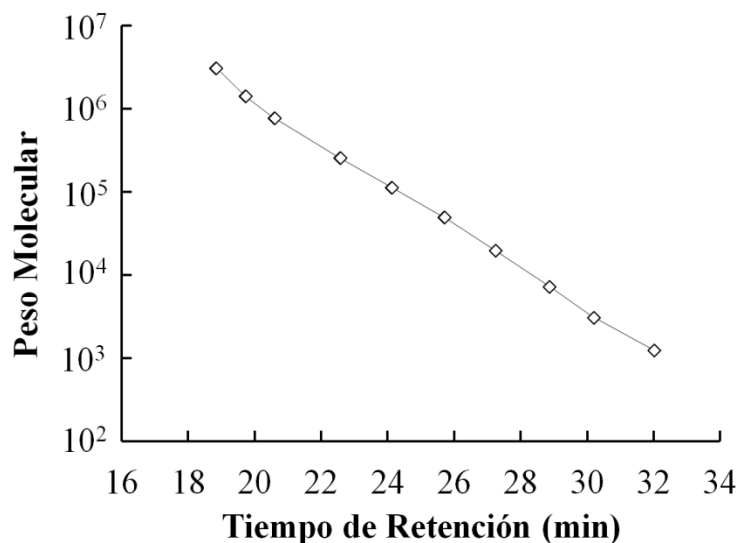
### 3.2.3 Cromatografía de Permeación en Gel (GPC)

La distribución del peso molecular para las diferentes membranas PLLA/PCL fue estudiada de igual manera a lo descrito en la sección 1.2.4. THF fue utilizado como fase móvil a un flujo de  $1\text{mL/min}$  y las muestras fueron preparadas al 1% *w/v* en THF/Dioxano (50/50 *v/v*). El concepto de calibración universal también fue empleado para estimar el peso molecular del PLLA y la PCL puros utilizando estándares de PS, y además los parámetros para el PLLA,  $K_{PLLA}=5.45 \times 10^{-5} \text{dL/g}$  y  $a_{PLLA}=0.73$  (Liu *et al.* 2005), según las Ecuaciones (3-2). Por otro lado, es necesario enfatizar que la distribución de peso molecular de las mezclas PLLA/PCL solo pueden ser referidas a los estándares de PS, pues las señales de cada polímero no pueden ser deconvolucionadas, y por tanto tampoco ser identificadas como correspondientes a las fracciones de PLLA y PCL, ya que estos polímeros muestran diferentes intensidades en la misma concentración.

$$\begin{aligned} K_{PS} \cdot M_{PSi}^{a_{PS}+1} &= K_{PLLA} \cdot M_{PLLAi}^{a_{PLLA}+1} \\ K_{PS} \cdot M_{PSi}^{a_{PS}+1} &= K_{PCL} \cdot M_{PCLi}^{a_{PCL}+1} \end{aligned} \quad (3-2)$$

Donde  $M_{PLLAi}$ ,  $M_{PCLi}$  y  $M_{PSi}$  son los pesos moleculares de PLLA, PCL y PS respectivamente, en los tiempos de retención  $i$ . La curva de calibración obtenida inyectando los patrones de PS en estas condiciones se representa en la Figura 3-2.

Figura 3-2. Curva de Calibración del GPC a partir de patrones de PS en THF, 1mL/min.



### 3.2.4 Ensayos de indentación

Las membranas de cada composición y tiempo de degradación fueron estudiadas mediante indentación utilizando un indentador cilíndrico de 1mm de diámetro, a una velocidad de compresión de 50mN/min hasta 500mN, en un dilatómetro Seiko EXTAR TMA/ss6000. La pendiente obtenida en el intervalo recto al inicio de la curva Esfuerzo vs Elongación, se corresponde con el módulo elástico por compresión. Una corrección que tiene en cuenta el efecto de una zona finita se aplicó siguiendo el método propuesto por Hayes para la determinación del módulo mecánico del cartílago basado en medidas de indentación (Hayes 1972) según la Ecuación (3-3):

$$\frac{d\tau}{d\varepsilon} = \frac{2 \cdot K \cdot E}{\pi \cdot R \cdot (1 - \nu^2)} \quad (3-3)$$

Donde

- $\tau$  Esfuerzo aplicado
- $\varepsilon$  Elongación
- $K$  Factor de corrección  $K(R, \nu)$
- $R$  Relación entre el radio del indentador y el espesor de la muestra
- $\nu$  Relación de Poisson (se asume  $\nu=0.5$ )
- $E$  Pendiente del tramo recto en la curva Esfuerzo vs Elongación.

### 3.2.5 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La estructura interna de las membranas en el tiempo cero y después de las 65 semanas de degradación fue observada mediante SEM. Para esto, cada membrana fue fracturada entre nitrógeno líquido, colocada sobre una montura de cobre y entonces recubierta con oro mediante *sputtering*. La estructura fue observada con un microscopio electrónico JEOL JSM5410 bajo una tensión de aceleración de 10kV.

## 3.3 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 3.3.1 Pérdida de peso

La Tabla 3–1 muestra el peso remanente para el PLLA y la PCL puros, como membrana y pellets durante la degradación según procedimiento descrito en el Anexo B. Se observa que la pérdida de peso para las muestras de PLLAB, PCLB y PLLA/PCL=0/100 no supera el 2%, mientras la membrana de PLLA 100/0 perdió prácticamente el 50% de su peso durante todo el intervalo de degradación.

**Tabla 3–1: Porcentaje de peso remanente después de la degradación para PLLA y PCL puros, como pellets y membranas.**

Semanas de Degradación	PLLAB	100/0	PCLB	0/100
0	100,0	100,0	100,0	100,0
11	99,8	89,0	99,8	98,7
33	98,5	71,3	98,8	98,3
65	101,1	51,9	98,5	102,1

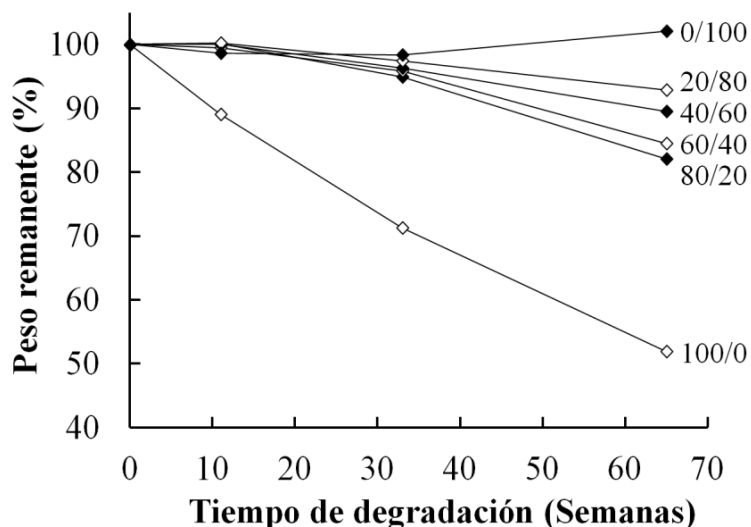
El aumento de peso de la membrana de PCL 0/100 y el PLLAB en las 65 semanas, es probablemente debida a la precipitación de sales que no fueron totalmente eliminadas, o también por la formación de carboxilatos de sodio a partir de las terminaciones de ácidos carboxílicos resultantes de la hidrólisis de los ésteres y el sodio presente en los buffers salinos (Li *et al.* 1995). Este proceso puede ser prominente en las membranas de PLLA/PCL debido a su gran porosidad y gran superficie específica lo que permite el incremento aparente del peso de las membranas. De hecho, la verificación del residuo después de una pirolisis mostró que muestras de la membrana



20/80 en la semana 65 tenía un residuo sólido de 3%. Esta observación del incremento aparente de peso debido a una extensiva neutralización es consistente con una alta degradación y formación significativa de ácidos carboxílicos.

La evolución de la pérdida de peso para las membranas PLLA/PCL, hasta las 65 semanas de degradación se muestra en la Figura 3-3. Se aprecia que las membranas con alto contenido de PLLA, PLLA/PCL=100/0, PLLA/PCL=80/20 y PLLA/PCL=60/40, presentan una mayor pérdida comparando con las membranas de alto contenido de PCL, PLLA/PCL=40/60, PLLA/PCL=20/80, PLLA/PCL=0/100. Este resultado es acorde con lo esperado, ya que el PLLA es más susceptible a la degradación que la PCL.

**Figura 3-3. Peso remanente durante la degradación de las membranas PLLA/PCL**



### 3.3.2 Medición del contenido de PLLA en las membranas

Como se describió en la sección 3.2.1, el HPLC fue utilizado en la determinación de la concentración de PLLA en las membranas. La Figura 3-4 representa el cromatograma típico de una mezcla PLLA/PCL después de su hidrólisis alcalina, donde pueden observarse el pico asociado al ácido l-láctico a los 2,7min y un pico menos definido a un tiempo de retención más largo, variable en cada inyección, y que se asigna a oligómeros de bajo peso molecular de la PCL; por tanto, puede inferirse que el medio alcalino no fraccionó la PCL en unidades monoméricas (que producirían un pico definido en un tiempo específico) sino que fue fraccionada en oligómeros. El pico formado en 1,5min es de igual intensidad en cada inyección, es decir, independiente de la

concentración del ácido l-láctico, por lo que puede asociarse a la solución de sales en que la muestra se ha preparado. El área del pico a los 2,7min permite hallar la concentración del ácido l-láctico en la muestra; se utiliza una curva de calibración previamente construida con PLLA puro hidrolizado en solución de NaOH y en las mismas condiciones y concentraciones conocidas como puede observarse en la Figura 3-5.

Figura 3-4. Cromatograma de HPLC típico de una muestra de PLLA/PCL degradada

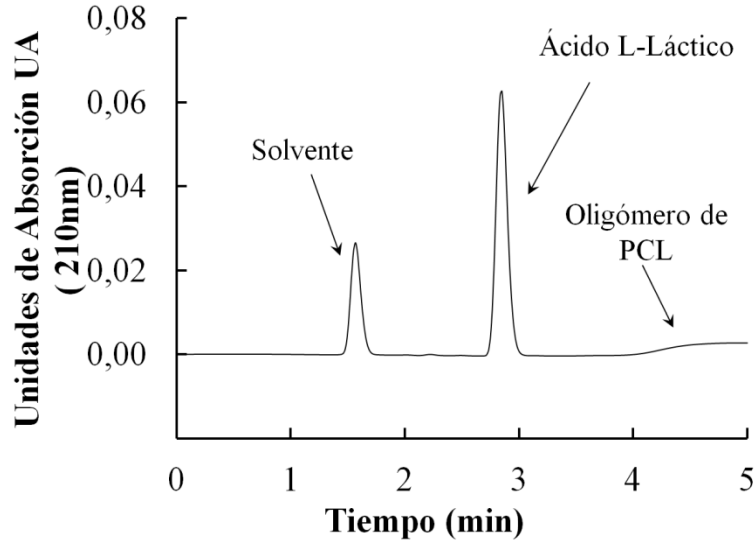
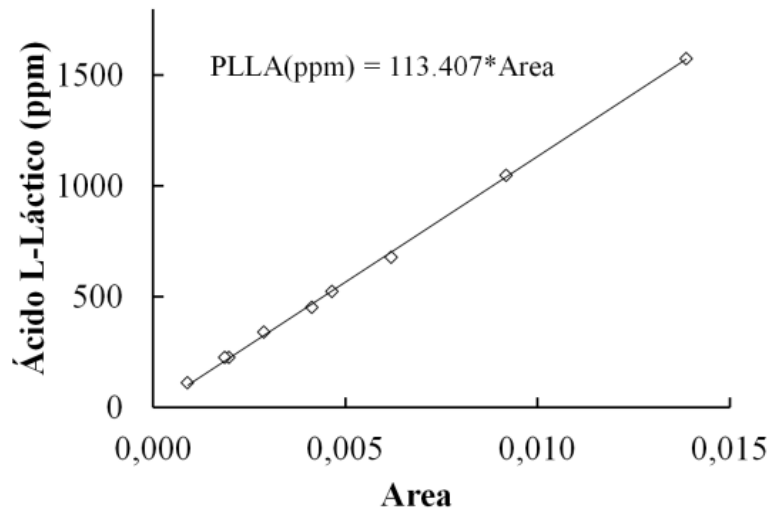
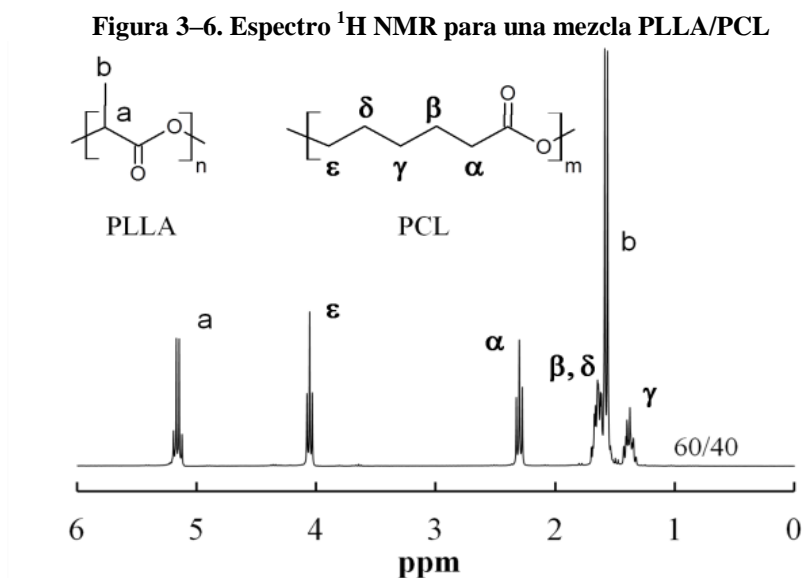


Figura 3-5. Curva de Calibración de la concentración del ácido l-láctico para HPLC



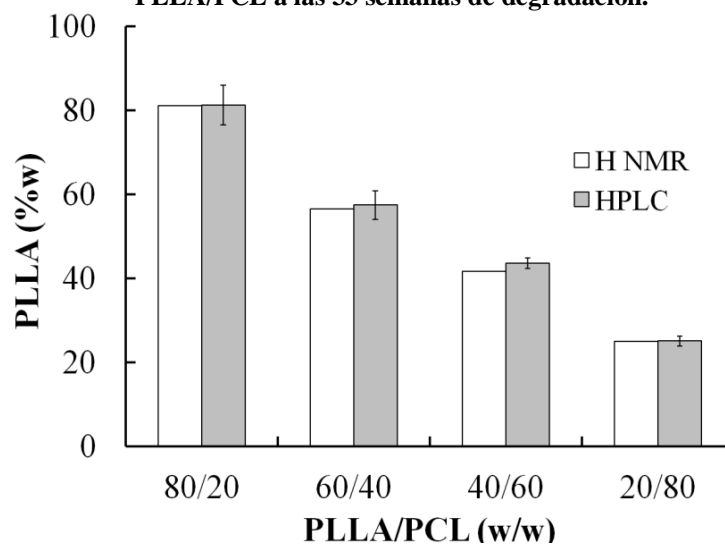
La validación de los resultados del HPLC se realizó mediante su comparación con los datos obtenidos por  $^1\text{H}$  NMR, únicamente para las membranas degradadas hasta 33 semanas. En la

Figura 3-6 se aprecia el espectro  $^1\text{H}$  NMR de la mezcla PLLA/PCL; los picos en 5,2 y 1,6ppm corresponden a los protones *a* y *b* respectivamente para el PLLA. Los picos en 1,38, 1,64, 2,31 y 4,06ppm corresponden a los protones  $\gamma$ ,  $\beta$ - $\delta$ ,  $\alpha$  y  $\varepsilon$  respectivamente (Wang *et al.* 1998). Los picos utilizados para cuantificar la relación PLLA/PCL *w/w* son los correspondientes *a* y  $\varepsilon$ .



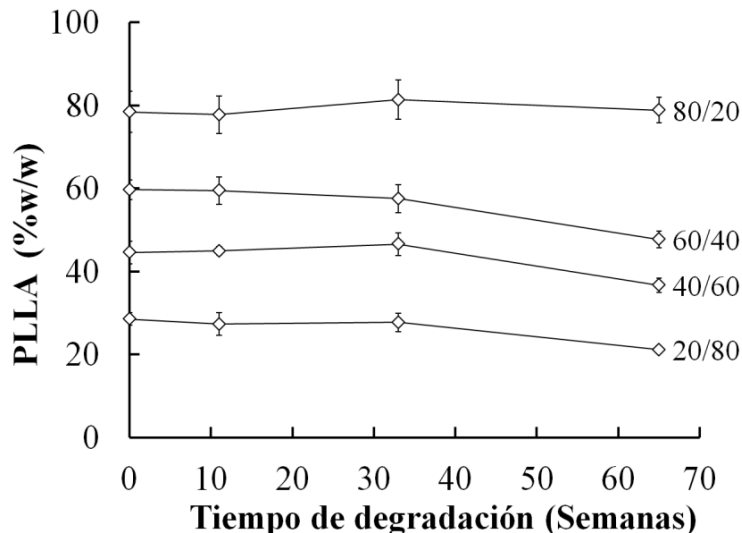
En la Figura 3-7 se observa que el contenido de PLLA medido mediante HPLC es similar a lo obtenido por  $^1\text{H}$  NMR, con un error promedio de 0,7% y un error máximo inferior a 2%. Por tanto, el HPLC en la medición del contenido de PLLA se considera una técnica adecuada.

**Figura 3-7. Contenido de PLLA obtenido mediante HPLC y  $^1\text{H}$  NMR en las membranas de PLLA/PCL a las 33 semanas de degradación.**



Una vez determinada la validez del HPLC, se analizan todas las membranas por este método. La Figura 3–8 ilustra los contenidos de PLLA durante la degradación. Las fracciones de PLLA, antes de la degradación en PBS, son similares a las fracciones de PLLA que se esperan teóricamente para PLLA/PCL=80/20 y PLLA/PCL=60/40; sin embargo son un 5% mayor que el esperado para PLLA/PCL=40/60 y PLLA/PCL=20/80.

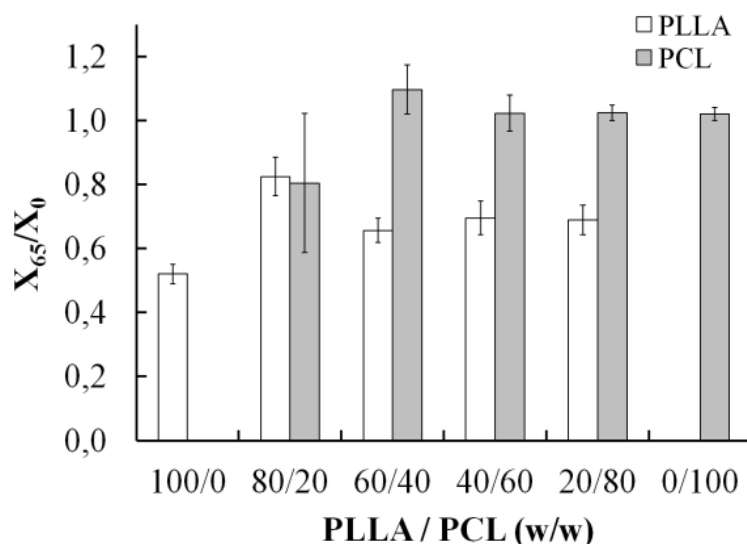
Figura 3–8. Contenido de PLLA durante la degradación de las membranas PLLA/PCL



Durante la degradación, la fracción de PLLA en las membranas PLLA/PCL=60/40, PLLA/PCL=40/60 y PLLA/PCL=20/80 disminuyó significativamente ( $p=0,01$ ) hasta la semana 65, comparando con la fracción inicial; entonces, para estas composiciones la pérdida de peso en principio corresponde principalmente a la degradación del PLLA. Por el contrario, la fracción del PLLA en la membrana PLLA/PCL=80/20 durante las 65 semanas permanece constante, por tanto, la pérdida de peso en esta membrana no puede atribuirse exclusivamente a la degradación del PLLA sino que, tanto la PCL como el PLLA fueron degradados y eliminados en proporciones similares. Así, al comparar el contenido de PLLA remanente en las mezclas con la membrana pura de PLLA 100/0, puede inferirse que la PCL en las membranas limita la pérdida del PLLA, tanto si el PLLA está en contenido mayor al 60% es la matriz continua con la PCL dispersa en tamaños submicrométricos, como si el PLLA está disperso dentro de la PCL en la situación opuesta, y teniendo en cuenta que las mezclas de PLLA/PCL sufren una separación de fases, incluso al congelar a partir de una disolución (Lebourg *et al.* 2008).

La relación entre el contenido final del PLLA y la PCL respecto a sus proporciones iniciales, se muestran en la Figura 3–9, donde  $X_0$  es la fracción del polímero en el momento de iniciar la degradación y  $X_{65}$  es la fracción en la semana 65.

**Figura 3–9. Relación del contenido de PLLA y PCL entre 0 semanas ( $X_0$ ) y 65 semanas ( $X_{65}$ ) durante la degradación de las membranas PLLA/PCL.**



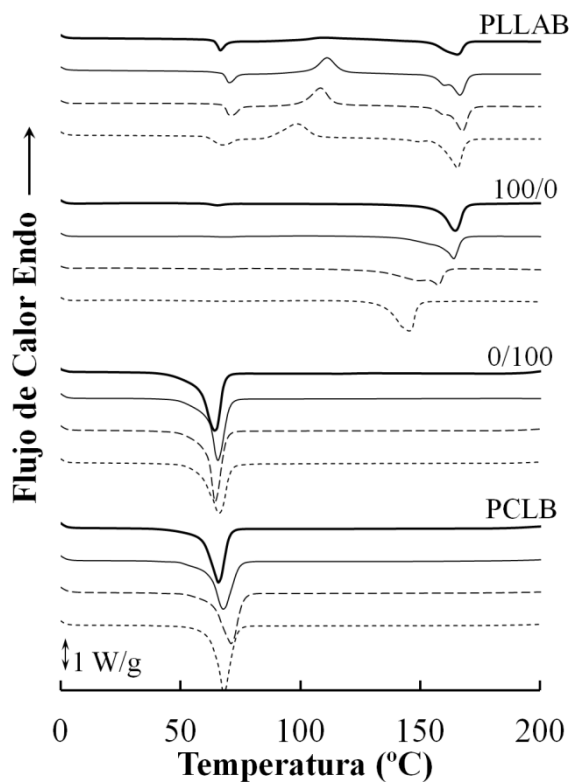
De ahí se puede deducir que, con excepción de PLLA/PCL=80/20, el PLLA remanente a las 65 semanas representa entre 65 y 70% de su cantidad inicial. Para PLLA/PCL=80/20 el PLLA remanente está alrededor del 80% mientras en la membrana de PLLA 100/0 corresponde solo a un 52%. Igualmente, en la membrana PLLA/PCL=80/20, la PCL y el PLLA sobrellevaron una pérdida aproximada del 20%, siendo un caso excepcional, ya que para las demás muestras la pérdida de la PCL no fue significativa. Considerando la influencia en la repartición de fases en el comportamiento de la degradación, no es posible concluir que la incorporación del PLLA dentro de una matriz de PCL lo proteja de la hidrólisis, ya que la proporción de PLLA que se pierde permanece casi constante, cerca del 40% para PLLA/PCL=20/80, PLLA/PCL=40/60 y PLLA/PCL=60/40.

### 3.3.3 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

El primer calentamiento permitió obtener información acerca de la estructura de la muestra después de su degradación hidrolítica. El segundo calentamiento fue medido después de eliminar su historia térmica y recristalizar desde el estado fundido. Las áreas correspondientes a la fusión y

la cristalización en frío fueron calculadas para determinar la fracción cristalina de cada componente. La transición vítrea del PLLA y la fusión de la PCL están alrededor de  $60^{\circ}\text{C}$ , a continuación la cristalización en frío del PLLA toma lugar entre  $110$  y  $120^{\circ}\text{C}$ , y por último el pico de fusión del PLLA se registra entre  $160$  y  $170^{\circ}\text{C}$ .

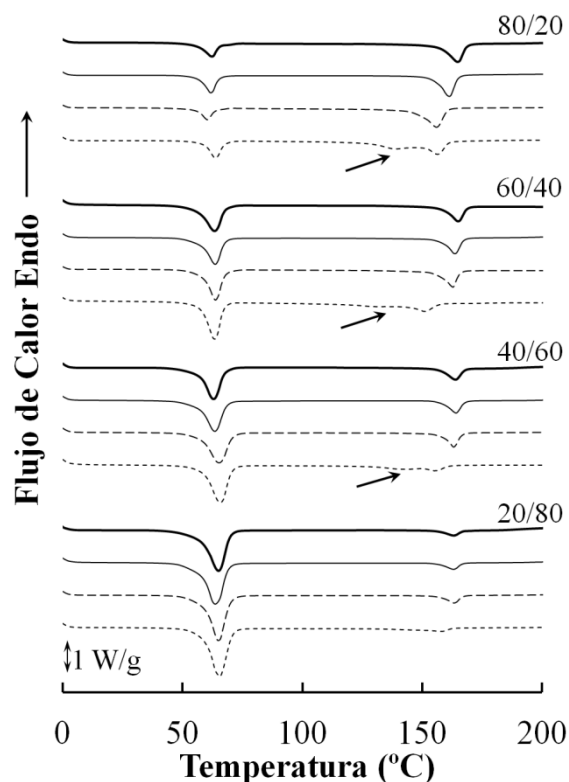
**Figura 3–10. Termogramas DSC. PLLA y PCL puros como pellet y membrana. Primer calentamiento. 0 semanas (————), 11 semanas (————), 33 semanas (— — — —), 65 semanas (-----).**



El primer calentamiento para el PLLA y PCL puros, tanto pellet como membrana, se representa en la Figura 3–10. Se aprecia que el pico de fusión de la PCL no presenta mayores cambios en su forma y posición durante la degradación, lo que indica que no han sucedido mayores cambios en su estructura cristalina. Considerando el PLLA puro, las curvas del PLLAB evidencian la transición vítrea bien definida, un pico de cristalización en frío y un pico de fusión de igual magnitud, es decir que las cadenas que cristalizan se funden en el mismo barrido; esto indica que los pellets de PLLAB mantienen su estado amorfo durante la degradación. Se destaca que el pico de cristalización adquiere mayor intensidad desde la semana 11 respecto al pellet sin degradar, debido probablemente a una mayor libertad de las zonas amorfas para cristalizar, al ser fraccionadas hidrolíticamente. Por el contrario, la membrana de PLLA 100/0 tiene una transición vítrea menos

evidente y no muestra cristalización en frío, sino únicamente el correspondiente pico de fusión, lo que indica su carácter semicristalino. El pico de fusión se evidencia en menores temperaturas a medida que aumenta el tiempo de degradación, asociado esto a un espesor de la lamela cada vez menor.

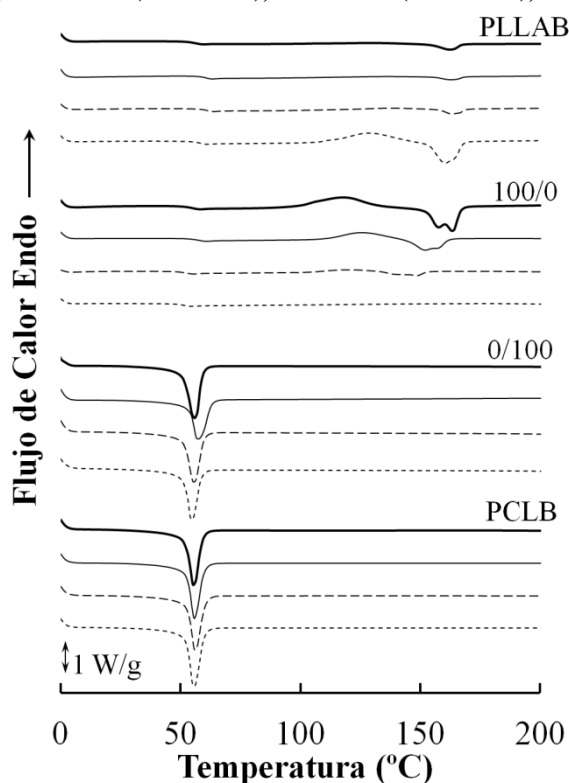
**Figura 3–11. Termogramas DSC. Membranas PLLA/PCL. Primer calentamiento. 0 semanas (—), 11 semanas (— — —), 33 semanas (---), 65 semanas (-----). Se señala un segundo pico de cristalización de PLLA a las 65 semanas de degradación.**



Los termogramas del primer calentamiento para las membranas PLLA/PCL se aprecian en la Figura 3–11. En este caso, la intensidad del pico de fusión de la PCL es proporcional al contenido de PCL, y la temperatura de fusión así como la forma del pico no cambian apreciablemente durante la degradación. Por el contrario, aunque la intensidad del pico de fusión del PLLA es también proporcional al contenido de PLLA, el pico se amplía mientras se ubica en menores temperaturas y un segundo pico de fusión es detectado en altos tiempos de degradación, según lo indican las flechas sobre los termogramas. Este segundo pico puede ser asociado a un segundo y más pequeño tamaño de la lamela del cristal, formado por cadenas de bajo peso molecular producto de la escisión durante la degradación hidrolítica, como se discutirá más adelante.

En el segundo calentamiento, que se observa en la Figura 3–12 y la Figura 3–13, para todas las membranas que contienen PLLA, la cristalización en frío y su respectiva fusión, hacen presencia hasta la semana 33 de degradación a menores temperaturas a medida que el tiempo de degradación aumenta; ya en la semana 65 no se aprecia cristalización en frío, lo cual indica que la fase fundida después del primer calentamiento ya no tiene la capacidad de recrystalizar debido a la acción de una degradación térmica adicional, que habría producido oligómeros demasiado pequeños para ser recrystalizados, además de una posible pérdida de ácido l-láctico en su punto de ebullición (119°C).

**Figura 3–12. Termogramas DSC. PLLA y PCL puros como pellet y membrana. Segundo calentamiento.**  
0semanas(————), 11semanas(———), 33semanas(- - - -), 65semanas(-----).

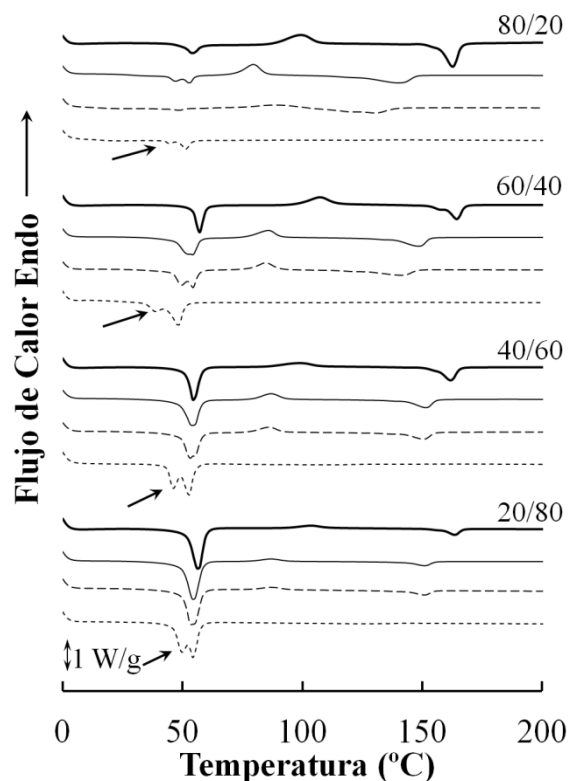


La estructura cristalina formada desde el estado fundido para la PCL en estado puro, como pellet y membrana, presenta un único e invariable pico de fusión en todo sus termogramas de segundo calentamiento, como se aprecia en la Figura 3–12, es decir, su estructura cristalina no ha sido modificada aún después de la degradación hidrolítica y el primer calentamiento. Por el contrario en las mezclas, la PCL evidencia un segundo pico de fusión, que se presenta en menor tiempo de degradación a mayor cantidad de PLLA, señalado por flechas sobre los termogramas en la Figura 3–13. Esto apunta a que la PCL dentro de la mezcla fue más susceptible a la degradación térmica



después de borrar su historia térmica, debido a la previa degradación hidrolítica, dada la acidificación del medio por parte de las terminaciones carboxílicas producidas a partir de la hidrólisis de las cadenas de PLLA.

**Figura 3–13. Termogramas DSC. Membranas PLLA/PCL. Segundo calentamiento. 0 semanas (—), 11 semanas (— — — —), 33 semanas (— · — · — ·), 65 semanas (— · — · — ·). Se señala un segundo pico de cristalización de la PCL en las 65 semanas de degradación.**



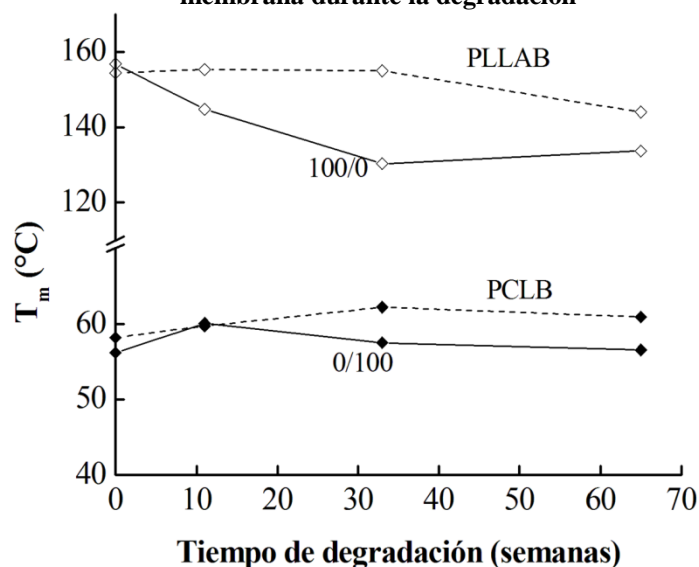
### 3.3.4 Temperaturas de Fusión

De la Figura 3–14 puede concluirse que las membranas tanto de PLLA como de PCL presentan menores temperaturas de fusión que las correspondientes temperaturas de fusión de los pellets. En el caso de la PCL, esto se da como resultado de la presencia de cristales de menor tamaño en la membrana degradada en comparación con los pellets degradados, lo que indica una diferencia en el mecanismo de degradación de ambos estados.

Para el PLLA, es necesario tener presente que los cristales del pellet no hacen parte de la muestra original, sino que son formados en la cristalización en frío durante el primer calentamiento del DSC, a diferencia de los cristales de la membrana que son formados por el rápido enfriamiento

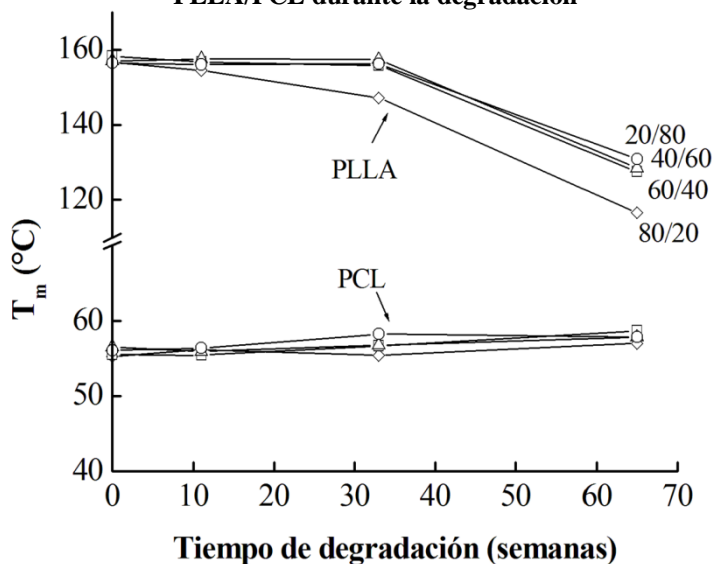
durante su fabricación mediante *freeze extraction*; aun a pesar de la diferencia en el proceso de cristalización, en ambos caso se produce una misma forma cristalina del PLLA, denominada forma  $\alpha$ , que tiene 2 cadenas contrarias en forma helicoidal  $10_3$  (la cadena forma una hélice que realiza 3 giros por cada 10 unidades monoméricas) y ubicadas dentro de una celda pseudo-ortorómbica con parámetros  $a=1.066nm$ ,  $b=0.616nm$  y  $c=2.888nm$  (Di Lorenzo *et al.* 2011). Teniendo esto presente para PLLAB, las cadenas se organizan en cristales cada vez más pequeños, durante el calentamiento del DSC, a medida que sus cadenas son más pequeñas debido a la degradación. Por otro lado, en la membrana de PLLA 100/0 podría inferirse que los cristales se vuelven cada vez más pequeños, situación improbable por la resistencia de la fase cristalina a ser degradada, siendo más factible la cristalización de pequeñas cadenas provenientes del rompimiento de la fase amorfa durante la degradación.

**Figura 3–14. Evolución de la temperatura de fusión,  $T_m$ , para el PLLA y la PCL puros como pellet y membrana durante la degradación**



Analizando ahora las mezclas y según la información de la Figura 3–15, la temperatura de fusión del PLLA se comportó en forma similar para todas las membranas, con una reducción proporcional al contenido de PLLA, lo que indicaría la presencia de cristales de PLLA más pequeños a medida que aumenta el tiempo de degradación. En el caso de la PCL, es evidente que su temperatura de fusión no fue alterada en ninguna composición durante todo el período de degradación, por tanto su estructura cristalina no ha sido alterada, como ya era evidente en los termogramas de DSC.

**Figura 3–15. Evolución de la temperatura de fusión,  $T_m$ , para el PLLA y la PCL en las membranas de PLLA/PCL durante la degradación**



### 3.3.5 Cristalinidad

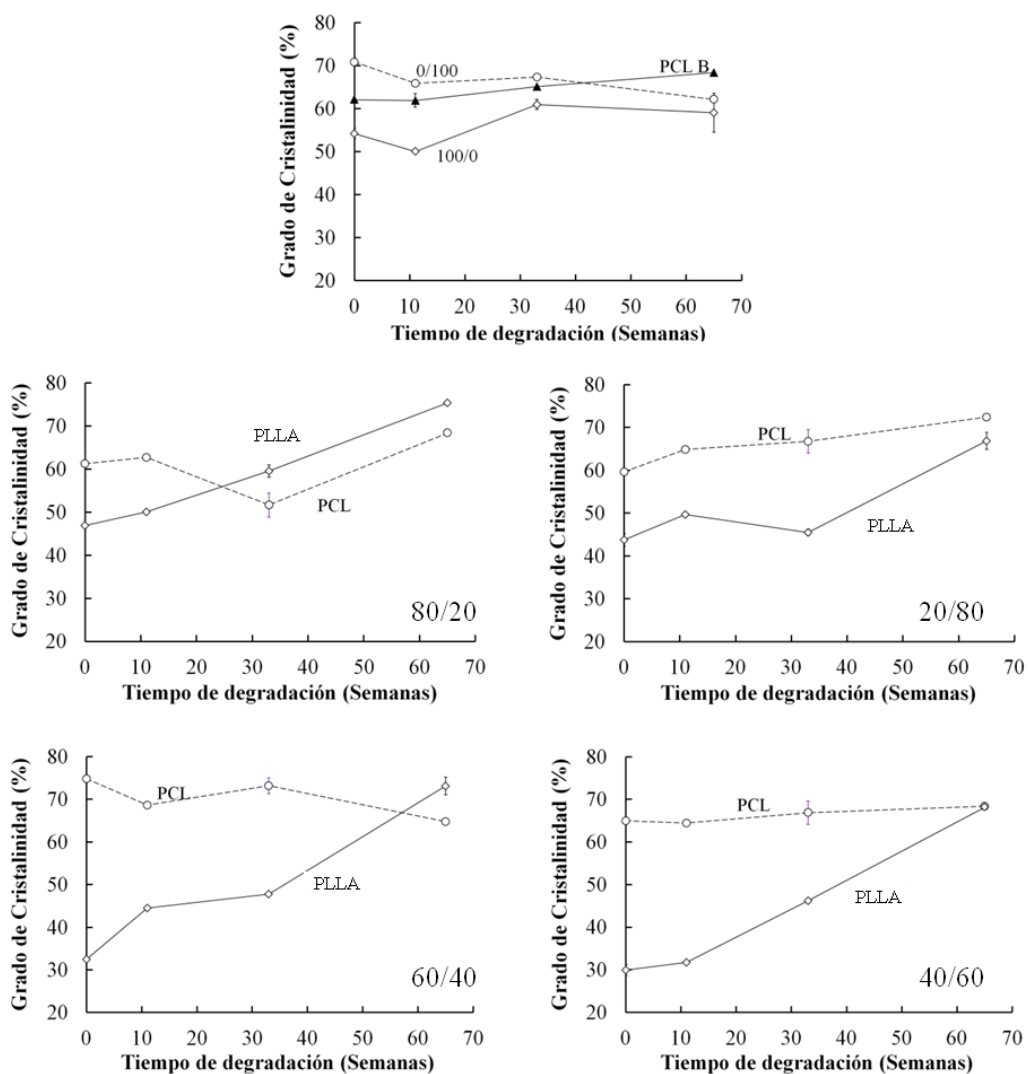
El grado de cristalinidad para el PLLA y la PCL, tanto en membranas como en pellets, se representa en la Figura 3–16. El PLLAB no es representado debido a la equivalencia de los picos de cristalización en frío y fusión, lo que evidencia su estado totalmente amorfo antes y durante la degradación.

Para cristalizar el PLLA son necesarias velocidades de enfriamiento menores de  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (Wang *et al.* 2005, Salmerón *et al.* 2005, Salmerón *et al.* 2007) pero durante el proceso de *freeze extraction*, cuya velocidad de enfriamiento es mucho mayor, el PLLA cristaliza desde la solución obteniendo grados de cristalinidad mayores de 30%, aumentando hasta el 50 y 65% durante la degradación hidrolítica, según su composición.

La diferencia en el grado de cristalinidad del PLLA en todas las membranas coincide con lo reportado en la literatura al observarse la degradación hidrolítica del PLLA, afirmando que la degradación de muestras cristalinas se alcanza por los defectos y terminaciones de cadena ácidas en las zonas amorfas de las esferulitas, lo que incrementa la penetración de agua y por tanto, la velocidad de escisión (Tsuji *et al.* 2000). Es decir, existe una degradación preferencial de la parte amorfa del PLLA y por tanto un incremento en su grado de cristalinidad. Sin embargo, durante la degradación de las membranas PLLA/PCL con certeza existe un proceso adicional: a partir de la

reducción de la longitud de cadenas de la zona amorfa, estas cadenas cristalizan dado el efecto plastificante del agua, fenómeno documentado para la degradación hidrolítica (Li *et al.* 1995, Zhang *et al.* 2008). En resumen, el grado de cristalinidad del PLLA aumenta por la disminución de su zona amorfa, y además, por la reconfiguración de cadenas de bajo peso molecular para formar nuevos cristales.

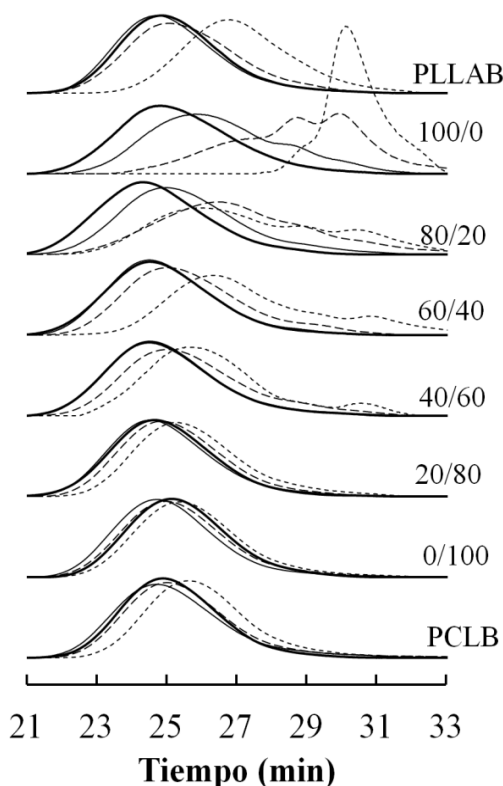
**Figura 3–16. Evolución del Grado de Cristalinidad del PLLA y la PCL en las membranas de PLLA/PCL durante la degradación.**



### 3.3.6 Distribución del Peso Molecular

Según puede apreciarse en la Figura 3-17 y como era de esperarse, se obtienen mayores tiempos de retención en los perfiles de GPC en mayores tiempos de degradación, es decir, menor peso molecular para todas las composiciones, obteniendo polímeros con mayor polidispersidad, cuyos valores se presentan en la Tabla 3-1.

**Figura 3-17. Cromatogramas de GPC de las membranas PLLA/PCL en THF, 1mL/min. 0semanas (————), 11semanas(————), 33semanas(- - - -), 65semanas(-----).**



El pellet de PLLAB se degrada en menor medida, manteniendo la forma de su distribución de peso molecular, lo que es consistente con un mecanismo por erosión. Por el contrario, la membrana de PLLA 100/0 evidencia una drástica reducción del peso molecular y su distribución es totalmente alterada, lo que puede explicarse mediante un mecanismo de degradación en masa; así, a las 65 semanas se aprecian picos entre los 29 y 31 minutos, tanto para la membrana de PLLA 100/0 como para membranas de alto contenido de PLLA incluyendo PLLA/PCL=40/60, picos que corresponden a oligómeros de PLLA con pesos moleculares entre  $7,8 \times 10^3$  y  $2,2 \times 10^3$ .

**Tabla 3–2. Cambio del Índice de Polidispersidad para las membranas PLLA/PCL durante la degradación.**

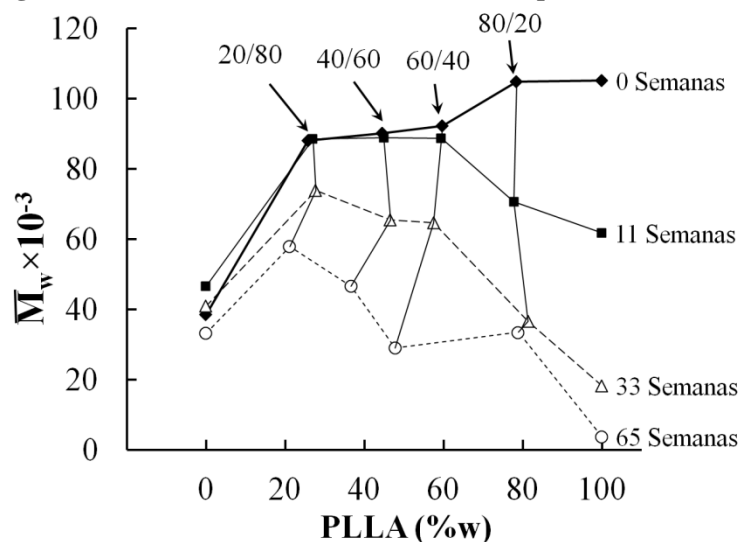
Membranas	Índice de Polidispersidad PDI			
	Tiempo de Degradación (Semanas)			
	0	11	33	65
PLLAB	2,2	2,2	2,4	2,6
100/0	2,6	3,4	4,2	1,3
80/20	2,2	3,1	6,5	7,5
60/40	2,3	2,3	3,0	6,3
40/60	2,4	2,4	3,3	3,6
20/80	2,2	2,4	2,3	2,6
0/100	1,9	2,2	2,3	2,5
PCLB	1,9	2,7	3,5	3,1

En referencia al polímero puro de PCL, el comportamiento es particular: la pérdida de peso molecular es mayor para el pellet que para la membrana. Esto podría explicarse mediante el mecanismo de erosión, tanto para membrana como para el pellet, pero de mayor efectividad sobre el pellet, ya que los oligómeros producto de la degradación tienen mayor volumen para su difusión a los alrededores del pellet que en el interior de la membrana, limitando la salida de los oligómeros de los poros y por tanto disminuyendo su velocidad de degradación.

Considerando ahora las mezclas, la forma de las curvas de elución para las membranas con alto contenido de PCL se mantiene, mientras se mueve hacia tiempos de retención mayores, similar al comportamiento de la membrana de PCL 0/100, lo que indica un mecanismo de erosión para la PCL; así mismo, los cromatogramas de las membranas con alto contenido de PLLA evidencian un mayor tiempo de retención y también la aparición de nuevos picos, de forma similar a la membrana de PLLA 100/0, lo que indica un mecanismo de degradación en masa al interior de la matriz polimérica

El cambio en el peso molecular promedio,  $\bar{M}_w$ , y su relación con el contenido de PLLA a lo largo de la degradación se resumen en la Figura 3–18, donde se aprecia que a mayor tiempo de degradación y mayor contenido de PLLA el peso molecular promedio disminuye.

**Figura 3–18. Cambio en el Peso Molecular Promedio en Peso,  $\bar{M}_w$ , de las membranas PLLA/PCL durante la degradación en relación con el cambio en la composición durante la degradación.**



La cristalización de cadenas parcialmente degradadas formando pequeños cristales altamente resistentes a la disolución y a la hidrólisis, pueden explicar porqué todavía permanece el 50% de la membrana de PLLA 100/0 en la semana 65, mientras que el peso molecular es menor que el peso molecular crítico que limita la solubilidad de oligómeros de PLLA: 2.000, cuando el límite mínimo es 10.000 (Zhang *et al.* 2008).

Esta cristalización de cadenas cortas puede ser la razón para la aparición de perfiles de elución bi o trimodales en la fase de PLLA, como es mencionado en la literatura (Tsuji *et al.* 2000), describiendo que la degradación de la mayoría de partes amorfas en cada lado de la cristalita produce un pico del más bajo peso molecular específico,  $M_s$ , que en este caso es asociado al pico entre 30 y 31 minutos en los perfiles de GPC, y que pueden ser relacionados con el espesor  $L_c$  de la cristalita mediante la Ecuación (3–4)

$$L_c(nm) = 0,278 \cdot \frac{M_s}{72,1} \quad (3-4)$$

Siendo 72,1 el peso molecular de una unidad monomérica de PLLA y 0,278nm la longitud de una décima parte una hélice típica  $10_3$ ; se asume además que  $M_s$  es característico de una cadena de PLLA de un plegamiento (*onefold chain*) en la región cristalina. Se comprobó esta hipótesis comparando  $L_c$  obtenido de la Ecuación (3–4) con la temperatura de fusión observada, siguiendo

una relación inversamente proporcional entre la temperatura de fusión,  $T_m$ , y  $L_c$ , según la expresión de Thomson-Gibbs de la Ecuación (3-5):

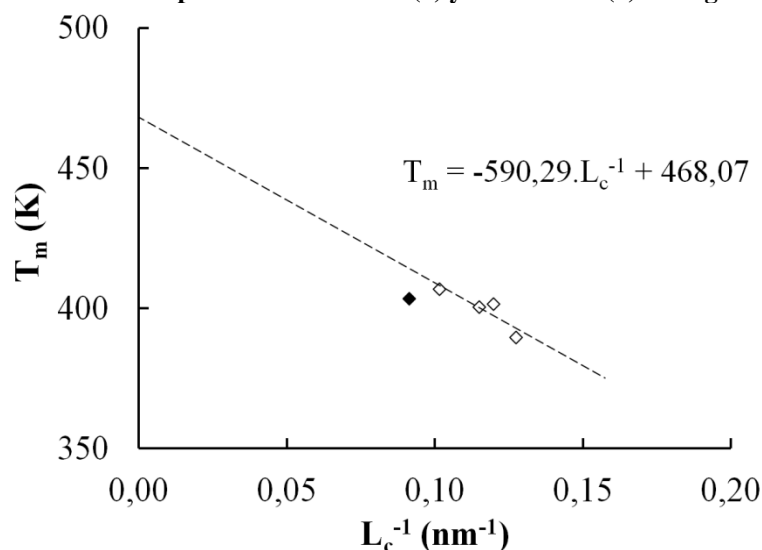
$$T_m = T_m^o \left( 1 - \frac{2\sigma}{\Delta h^o \cdot \rho_c \cdot L_c} \right) \quad (3-5)$$

Donde

- $T_m^o$  Temperatura de fusión en el equilibrio  
 $\sigma$  Energía libre específica de plegamiento superficial  
 $\Delta h^o$  Calor de fusión  
 $\rho_c$  Densidad de cristal

Se aplican los mismos cálculos y representación gráfica a los resultados aquí obtenidos, específicamente para aquellas muestras que mostraron un pico definido entre 29 y 31 minutos, es decir PLLA/PCL=100/0, PLLA/PCL=80/20, PLLA/PCL=60/40 y PLLA/PCL=40/60, a las 65 semanas. Se obtuvo entonces la relación que se muestra en la Figura 3-19. Para esta estimación no fue incluido el punto correspondiente a la membrana de PLLA 100/0 a las 33 semanas (punto con relleno negro), pues tan solo conlleva la mitad del tiempo de degradación de las demás muestras.

**Figura 3-19. Relación entre la temperatura de fusión,  $T_m$ , y la longitud de cristal calculado,  $L_c$ , del PLLA calculado para las 65 semanas ( $\diamond$ ) y 33 semanas ( $\blacklozenge$ ) de degradación.**



Como puede apreciarse, a pesar de los pocos puntos experimentales utilizados, esta podría tratarse como una relación lineal, teniendo en cuenta el valor de  $T_m^o$  obtenido por extrapolación, 195°C, es

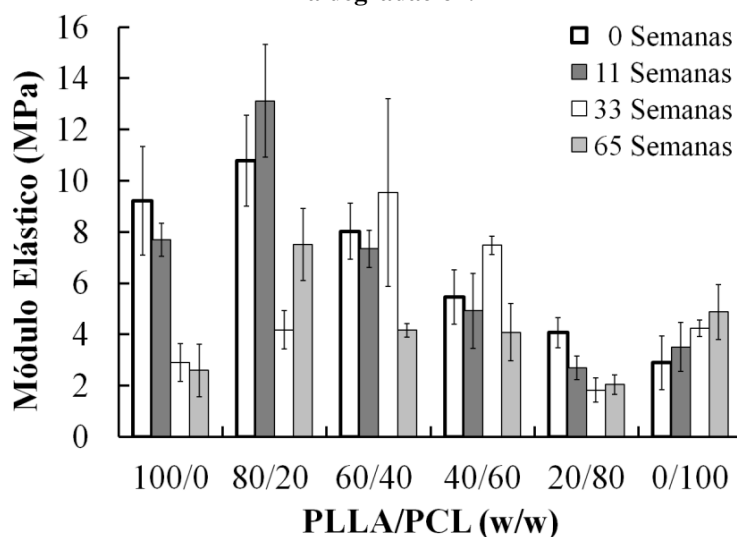


cercano al esperado teóricamente, 200°C, que es la temperatura de fusión en el equilibrio para un cristal infinito de PLLA (Tsuji *et al.* 2000, Tsuji *et al.* 1995).

### 3.3.7 Propiedades Mecánicas

La Figura 3–20 representa el módulo elástico de compresión para las membranas PLLA/PCL en función de la composición y tiempo de degradación. Inicialmente, en tiempo cero de degradación, se ve cómo el módulo decrece linealmente a medida que el contenido de PCL aumenta desde PLLA/PCL=80/20 hasta PLLA/PCL=0/100.

**Figura 3–20. Evolución del módulo elástico por compresión para las membranas PLLA/PCL durante la degradación.**



Diferentes tendencias se aprecian para diferentes composiciones de membranas. Para la membrana de PLLA 100/0 el valor del módulo decreció con el tiempo, muy seguramente debido a su elevada pérdida de masa, provocando una falta de integridad estructural. Sin embargo para las mezclas PLLA/PCL el módulo elástico no sigue una tendencia simple. Durante las primeras 33 semanas de degradación, el módulo parece seguir la misma tendencia que el grado de cristalinidad, como se observa en la Figura 3–16, pero en las últimas semanas el módulo es más influenciado por la pérdida de peso, que se describe en la Figura 3–3. Para la membrana de PCL 0/100 se presenta un incremento en el módulo que puede ser asociado con la degradación de las zonas amorfas dejando las zonas cristalinas más rígidas.

En general, la membrana 80 PLLA/PCL=20 presenta el valor más alto de módulo de elasticidad, comparado con las membranas de PLLA 100/0 y de PCL 0/100, a pesar de ser aquella que perdió más peso durante la degradación. La adición de PCL en la matriz polimérica, mejora en gran medida la resistencia a la acción hidrolítica sobre las membranas, inclusive en bajo contenido, como en el caso de PLLA/PCL=80/20. La existencia de un grado limitado de compatibilidad en las zonas amorfas explicaría por qué la membrana PLLA/PCL=80/20 es más resistente y menos frágil que la membrana de PLLA 100/0.

Para las membranas PLLA/PCL=100/0 y PLLA/PCL=20/80, el módulo elástico decrece monótonamente mientras que para composiciones intermedias existe una etapa de endurecimiento y una fase de debilitamiento. Este endurecimiento puede relacionarse con la recristalización del PLLA, mientras el debilitamiento se asocia con la desaparición de la zona amorfa intercrystalina. Por tanto, el endurecimiento aparece antes en PLLA/PCL=80/20 que en PLLA/PCL=60/40 y PLLA/PCL=40/60; para la membrana de PLLA 100/0 el endurecimiento es despreciable dada la inmediata y preferencial degradación de las zonas intercrystalinas, causando ya en la semana 11 que el módulo disminuya.

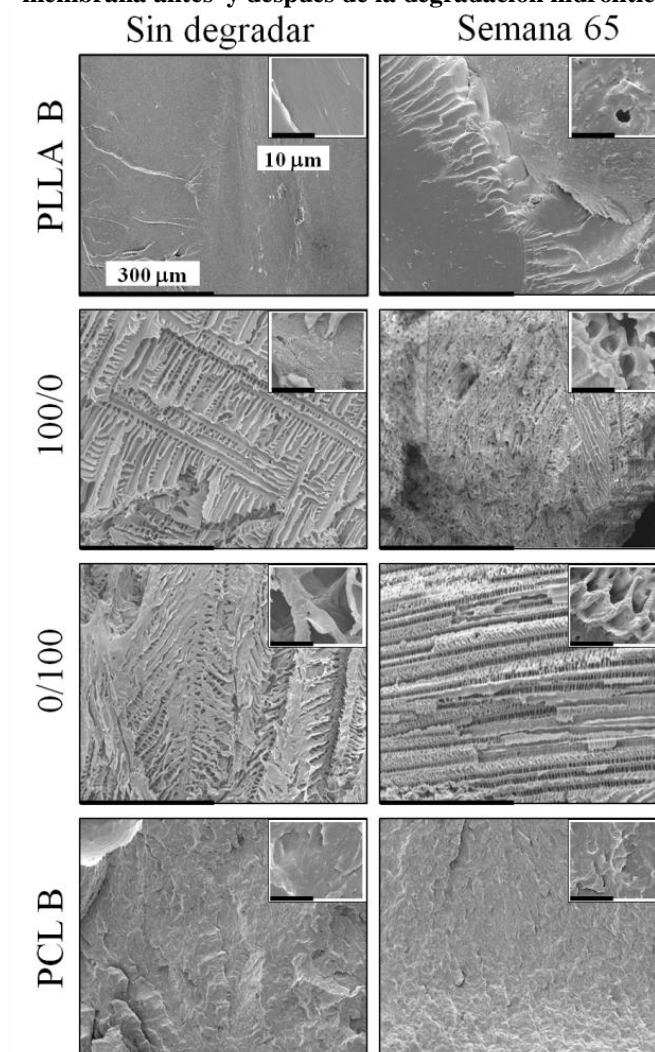
El efecto de debilitamiento de las zonas intercrystalinas es entonces más decisivo y provoca una caída rápida en las propiedades mecánicas. De hecho, esta disminución en las propiedades mecánicas de PLLA produce una fragilización de las membranas, pues después de tiempos cortos de degradación ya se evidenciaba este fenómeno, llegando a su fractura y desmoronamiento al perder resistencia y plasticidad. Las muestras se desmoronaron al sostenerlas con pinzas ya en la semana 33, lo que se explica como resultado de la formación de agregados de cristales que no están ligados entre sí por zonas amorfas.

En el caso de PLLA/PCL=20/80 la contribución de la cristalización a partir de cadenas de bajo peso molecular, puede considerarse muy pequeña o que ha contraído zonas dentro de la matriz polimérica produciendo desligamiento de la misma. A tiempos de degradación más largos el efecto de la pérdida de peso molecular, la lixiviación de cadenas de bajo peso molecular y el debilitamiento superan la contribución del aumento de la cristalinidad a las propiedades mecánicas.

### 3.3.8 Morfología Interna

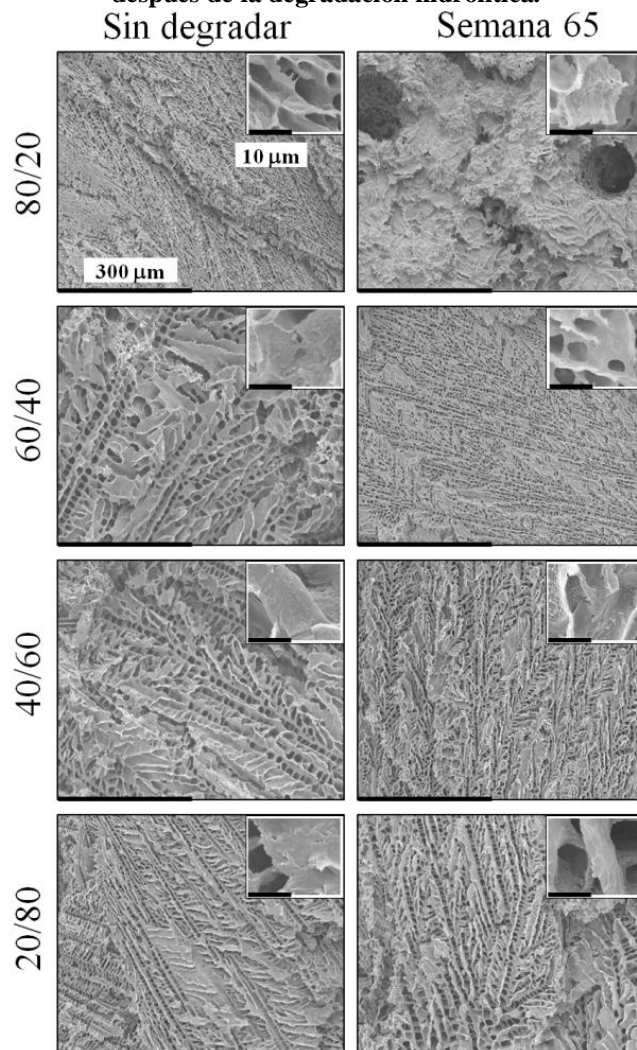
La Figura 3–21 y la Figura 3–22 representan la morfología interna de los pellets PLLAB y PCLB, y de las membranas antes y después de las 65 semanas de degradación, respectivamente. Las diferencias en estructura pueden apreciarse más fácilmente en la textura de los pellets como resultado de un incremento de cristalinidad. Un incremento en la rugosidad de la superficie después de la degradación se aprecia para todas las muestras, probablemente por la lixiviación de una parte de la matriz polimérica y la cristalización de cadenas de bajo peso molecular. Sin embargo la estructura general permanece bien conservada excepto para la membrana de PLLA 100/0, la cual se desmoronó durante la preparación de la muestra para SEM, lo cual indica que su estructura ha sido afectada en gran medida.

**Figura 3–21. Fotografías de SEM de la estructura interna del PLLA y la PCL, como pellet y membrana antes y después de la degradación hidrolítica.**



El mayor cambio en la estructura general es la pérdida de orden, con las líneas que forman los microporos se curvan y los poros están ligeramente colapsados. Estos efectos pueden ser producto de la pérdida de peso, contracción por la recristalización o plastificación durante la prolongada exposición al agua. Para PLLA/PCL=80/20 el PLLA se degrada menos de lo esperado y el PCL se degrada más de lo esperado, mostrando una desviación respecto al comportamiento de degradación independiente que cada polímero mostró en las otras membranas. Según lo discutido con anterioridad, y de acuerdo a la Figura 3-9, la pérdida de peso en las membranas es asociada a la disminución del contenido de PLLA mientras que la fase de PCL se conserva.

**Figura 3-22. Fotografías de SEM de la estructura interna de las membranas PLLA/PCL antes y después de la degradación hidrolítica.**



Sin embargo, este no es el caso para la membrana PLLA/PCL=80/20; esto puede ser explicado por la erosión de las micropartículas de PCL durante la degradación, que formaría pequeños huecos en la estructura de la membrana (grandes huecos son probablemente debidos a burbujas en la solución antes del enfriamiento súbito, según se ve en la Figura 3–21). Este fenómeno sería facilitado por la alta porosidad en las muestras y a la contracción que ambas fases sufren en la cristalización de las cadenas de bajo peso molecular durante la degradación, que podría debilitar las interfases y producir lixiviación de micropartículas ricas en PCL. En las demás membranas, esta lixiviación tendría menos presencia dada la mayor presencia de PCL comparada con la membrana PLLA/PCL=80/20. Inclusive, podría ser debido a la liberación de productos ácidos por la degradación del PLLA catalizando la degradación de las cadenas de PCL, incrementando su velocidad de escisión.



# 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 4.1 Conclusiones

### *Parte I. Poliuretanos de PCL y PEO*

Se estandarizó un método para la síntesis de poliuretanos PCL/PEO a partir de los macrómeros PCLdiol ( $\bar{M}_n \approx 2000$ ) y PEO4000 ( $\bar{M}_n \approx 4000$ ), y enlazados con HMDI, sintetizados en solución, obteniendo un copolímero en bloque, con rendimientos entre 85 y 95%, y peso molecular promedio en peso,  $\bar{M}_w$ , entre  $4 \times 10^4$  y  $6 \times 10^4$ .

Se verifica el carácter semicristalino de los poliuretanos PCL/PEO. A pesar del truncamiento de la cadena polimérica dada la presencia de los enlaces uretano, los segmentos de PCL y de PEO son capaces de cristalizar en cualquier composición, a partir del estado fundido o a partir de la evaporación de una solución polimérica; esto indica que los segmentos correspondientes al HMDI no impiden la cristalización, siendo estos grupos relegados a zonas no cristalizables.

En composiciones intermedias entre PCL y PEO, el comportamiento mecánico de los poliuretanos PCL/PEO está regido por el grado de cristalinidad y el tamaño de cristal, presentando mayor rigidez con un mayor contenido de PEO, dado a que los cristales de PEO son pocos pero mucho más grandes, en comparación con los cristales de PCL más numerosos y más pequeños.

Las relajaciones de cadena  $\alpha$  y  $\gamma$  fueron observadas en los poliuretanos PCL/PEO, y en el mismo intervalo de temperatura para el PEO y la PCL. Sin embargo esto debe atribuirse solamente a la superposición de las relajaciones debidas a uno y otro componente ya que la fase amorfa de cada componente actúa independientemente del otro componente. Existen indicios que apuntan a la presencia de la relajación  $\beta$  en bajas frecuencias para el PEO. Dada los efectos de la conductividad en la técnica dieléctrica, la presencia de una relajación entre la temperatura de transición  $\alpha$  y la temperatura de fusión no pudo ser verificada.

Los poliuretanos PCL/PEO mantienen su forma y consistencia durante la absorción de agua, a pesar de la hidratación de los segmentos de PEO, debido a que los enlaces uretano impiden la lixiviación de las cadenas de PEO fuera de la matriz polimérica. El poliuretano PCL/PEO=90/10 admitió el menor contenido de agua (15% *w*) entre las composiciones estudiadas, lo que le otorgaría una mayor capacidad de degradación respecto al poliuretano cuyos segmentos son exclusivamente de PCL; sin embargo, no posee capacidad osteoconductiva debido al 18% *w* de PEO presente en esta composición, cantidad excesiva con respecto a la adherencia celular.

### *Parte II. Poliuretanos de alto peso molecular y liberación de Risedronato de Sodio*

Se modificaron las proporciones en la polimerización, sintetizando poliuretanos PCL/PEO-HMW a partir de los macrómeros PCLdiol ( $\bar{M}_n \approx 2000$ ) y un menor contenido de PEO4000 ( $\bar{M}_n \approx 4000$ ), y enlazados a su vez con un mayor contenido de HMDI respecto a los poliuretanos PCL/PEO. Estos poliuretanos PCL/PEO-HMW se sintetizaron en solución, obteniendo copolímeros en bloque con rendimientos entre 85 y 95%, y un peso molecular promedio en peso,  $\bar{M}_w$ , entre  $1,1 \times 10^5$  y  $1,9 \times 10^5$ .

Los poliuretanos PCL/PEO-HMW también son semicristalinos. Sin embargo, comparados con los poliuretanos PCL/PEO, poseen menores temperaturas de transición vítrea y de fusión, debido a un menor grado de cristalinidad. Estos cambios en el contenido cristalino también se afectan las propiedades mecánicas, otorgando menor rigidez a los poliuretanos PCL/PEO-HMW.

Los poliuretanos PCL/PEO-HMW poseen mayor capacidad de absorción de agua respecto a los poliuretanos PCL/PEO, debido a su alta proporción de zonas amorfas, que combinada con un reducido contenido de PEO, brindaría mejores condiciones para aumentar la degradabilidad y mejorar la osteoconductividad.

No hay claridad respecto a la naturaleza de la distorsión encontrada en los ensayos de DMA, entre la temperatura de relajación  $\alpha$  y la temperatura de fusión para los poliuretanos PCL/PEO-HMW ricos en PEO, pues no hay suficientes indicios que le permitan ser asociada a una relajación de cadena adicional.



Sobre los poliuretanos PCL/PEO-HMW con bajo contenido de PEO, los osteoblastos sembrados tienen una baja adherencia celular. Sin embargo, esta propiedad es mejorada con la adsorción de fibronectina en la matriz polimérica, consiguiendo así que las células se ubiquen y expandan sobre su superficie.

La liberación de RSD desde partículas de HAp incorporadas dentro de la matriz polimérica de PCL/PEO-HMW, favorece la diferenciación celular al verificarse la producción de matriz extracelular y en mayor proporción en muestras con baja concentración de PEO.

Materiales compuestos basados en los poliuretanos PCL/PEO-HMW con la incorporación de FN e HAp+RSD, exhiben buenas propiedades de osteoconducción y proliferación osteoblástica, haciéndolos excelentes candidatos para la fabricación de implantes en la regeneración del tejido óseo.

### *Parte III. Caracterización de membranas de PLLA y PCL degradadas*

La degradación hidrolítica de membranas porosas hechas de PLLA y PCL fue estudiada, enfocándose en su evolución respecto a la pérdida de masa, distribución del peso molecular, composición y propiedades mecánicas.

Es posible modificar las propiedades y la velocidad de degradación de las membranas PLLA/PCL cambiando su composición, ya que se comportan de forma intermedia entre membranas puras de PCL y PLLA. En la mayoría de membranas la degradación de cada polímero sucede de manera independiente, más rápidamente para el PLLA que para la PCL; sin embargo la composición PLLA/PCL=80/20 mantiene su composición constante durante todo el tiempo de degradación, siendo ambos polímeros degradados en la misma proporción.

El aumento del contenido de PCL en la membrana limita la pérdida de masa asociada al PLLA durante la degradación: la membrana de PLLA puro pierde alrededor del 50% de su masa después de 65 semanas de degradación, mientras que las demás membranas perdieron solamente entre 20 y 33% de su contenido inicial de PLLA.

Las propiedades dúctiles de la PCL permiten mantener mayor tiempo las propiedades mecánicas de las membranas, en comparación con la membrana de PLLA puro que desde la semana 11 de degradación ya ha sido debilitada.

Un proceso de recristalización del PLLA fue observado en todas las membranas, conduciendo a un aumento del grado de cristalinidad, con la formación de cristales resistentes a la hidrólisis; como resultado de esta alta cristalinidad y de la degradación de las zonas amorfas, se evidenciaron cadenas monodispersas, cuyo tamaño puede correlacionarse con la temperatura de fusión, lo cual se asocia a cristales de PLLA de un plegamiento (*onefold chain*).

Teniendo en cuenta sus posibles aplicaciones en ingeniería de tejidos, la membrana PLLA/PCL=80/20 mostró el comportamiento más favorable, pues los efectos de la degradación fueron reducidos en gran medida por la incorporación del 20% de PCL al PLLA, mejorando inclusive la evolución de sus propiedades mecánicas.

## 4.2 Recomendaciones

La utilización de la difracción de rayos X, XRD (*X Ray Diffraction*), permitiría confirmar la presencia de cristales tanto de PCL como de PEO en composiciones alejadas del 50% *w* en los poliuretanos PCL/PEO, ya que los ensayos de DSC no aportan información suficiente para concluir al respecto.

Los poliuretanos PCL/PEO han de ser evaluados también en composiciones inferiores a 18% *w* de PEO respecto a sus propiedades osteoconductoras, limitando el intervalo de estudio a contenidos no mayores al 5% *w* de PEO, porcentaje que efectivamente permitió una adhesión celular sobre los poliuretanos PCL/PEO-HMW.

El aumento en la capacidad de absorción de agua dentro de la PCL con la adición de cadenas de PEO, inhibe la adhesión celular sobre el material. A pesar de esta desventaja, los poliuretanos PCL/PEO podrían ser estudiados también a manera de sustrato en cultivos tridimensionales, como ha sido reportado en la fabricación de *scaffolds* mediante *freeze drying* (Shokrollahi *et al.* 2010); también podrían ser estudiados mediante la comparación de su rendimiento con los copolímeros en

bloque del tipo PCL-PEO-PCL en la liberación de fármacos (Shahin *et al.* 2010, Wei *et al.* 2009b, Hu *et al.* 2003).

Se requiere llevar a cabo el estudio de degradabilidad *in vitro* de los poliuretanos PCL/PEO y PCL/PEO-HMW, para confirmar que el aumento en el contenido de PEO efectivamente permite una mayor velocidad de degradación y contrastar estos resultados con los obtenidos de osteoconductividad con el objeto de hallar una composición adecuada para ser evaluada como implante.

Las propiedades osteoconductoras de los poliuretanos PCL/PEO-HMW en composiciones de PEO mayores al 20%w, pueden ser estudiadas si se consigue fijar las muestras a un sustrato, como el vidrio, sin permitir su separación por la hidratación de la matriz polimérica. Podría emplearse algún tipo de pegamento, como por ejemplo aquellos basados en fibrina (Carmagnola *et al.* 2002, Le Nihouannen *et al.* 2008).

Las relaciones de cadena dentro de los poliuretanos de PCL/PEO y PCL/PEO-HMW, podrían ser estudiados de mejor manera al realizar los mismos ensayos de caracterización, específicamente DMA, en mezclas de PCL y PEO en las mismas proporciones y con peso molecular similar a los obtenidos en los poliuretanos aquí estudiados, y así aportar más elementos con los cuales estudiar estos copolímeros.

La evolución de la degradación hidrolítica de la membrana PLLA/PCL=80/20, ha de ser estudiada junto con sus propiedades osteoconductoras con el objeto de evaluar sus posibles aplicaciones dentro de la ingeniería tisular, específicamente como implantes en tejido óseo.



## A. ANEXO: CULTIVO CELULAR (OSTEOBLASTOS)

### SUBCULTIVO DE CÉLULAS MC3T3-E1 (OSTEOBLASTOS)

Preparación del medio de cultivo:

A una botella de Gibco DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Invitrogen) de 500mL se adiciona 10%v/v de FBS (*Fetal Bovine Serum*) y 1%v/v de P/S (*Penicillin / Streptomycin solution*); todas las soluciones deben permanecer refrigeradas hasta su uso. Los osteoblastos de la línea celular MC3T3-E1 de ratón, que se mantienen en un criotubo dentro de nitrógeno líquido en un tanque *Dewar*, se calientan a baño maría hasta 37°C así como el medio de cultivo. Se utilizan células de con un número de pases entre 14 y 16 para todos los ensayos. Pase se define como el proceso de tomar una parte del cultivo y trasladarlo a un recipiente distinto para iniciar un nuevo cultivo.

**Flascón o frasco de cultivo celular. Imagen de [www.calgonscientific.com](http://www.calgonscientific.com)**



- En un flascón T75 con 15mL de medio de cultivo se vierten los osteoblastos, asegurando que estén dispersos en toda el área del flascón.
- El flascón con el medio y los osteoblastos se dejan dentro de un incubador donde se mantienen a 37°C y una atmósfera al 5% CO<sub>2</sub> durante el tiempo necesario para obtener el número de células deseado, pero sin dejar que lleguen a confluencia (momento en que las células ocupan toda la superficie disponible para el crecimiento)

- Se aspira del flascón todo el líquido dejando las células adheridas en el fondo. A continuación se lava con 10mL de DPBS a 37°C.
- Se adicionan 5mL de una solución de Tripsina/EDTA, la cual hidroliza las proteínas de las células, liberándolas del fondo del flascón; se mantiene incubando por 5min.
- Se agregan 5mL del Medio de Cultivo con suero para detener la acción de la tripsina. Se homogeniza con suavidad y se transfiere a un tubo de centrifuga.
- Se centrifuga a 1000rpm durante 5min. El sobrenadante se elimina y sobre las células que quedan en el fondo se agrega 1mL del Medio de Cultivo, para posteriormente resuspender.
- Se toman 10µL de la suspensión y se cargan en una cámara Neubauer para cuantificar la concentración celular. Al realizar los cálculos y adiciones necesarias de Medio de Cultivo se espera obtener una concentración aproximada de 100.000células/mL.

### **CULTIVO SOBRE LOS POLIURETANOS PCL/PEO**

Se estudia el comportamiento celular sobre los poliuretanos PCL/PEO de composición PCL/PEO=100/0, PCL/PEO=90/10 y PCL/PEO=80/20. Se evalúa la adhesión y la proliferación de estas células usando un ensayo metabólico, durante el cual, el MTS (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxyphenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium) de color amarillento, es metabolizado y convertido a un compuesto púrpura por parte de las células vivas; a continuación la absorbancia es medida en un espectrofotómetro para cuantificar el número de células vivas en el material. El procedimiento se describe a continuación:

- Los poliuretanos PCL/PEO se esterilizan sumergiéndolos en una solución de etanol al 70% v/v, para posteriormente ser lavados con DPBS.
- Se prepara el subcultivo de células MC3T3-E1, según procedimiento ya descrito, y se siembran sobre los materiales en una placa multipocillo P24 utilizando aproximadamente 50.000células/pocillo, adicionando 500µL de suspensión celular por pocillo.
- Se deja en cultivo el tiempo deseado (4 días, 7 días o 14 días)
- Al tiempo deseado se retira de cada pocillo el líquido y se lava con DPBS. A continuación se adicionan 400µL de solución DMEM sin rojo fenol con reactivo MTS (1:5) y se mantiene protegido de la luz durante 2h.
- De cada pocillo se toman tres alícuotas de 100µL, y cada una se vierte en otro pocillo de una nueva placa multipocillo P96.

- Se coloca la placa multipocillo P96 en un lector de placas *Counter Multilabel 1420 VICTOR<sup>3</sup>*<sub>TM</sub> (Perkin Elmer), que mide la absorbancia a 490nm y la relaciona con el número de células.

**Placa Multipocillo P96. Imagen de [www.amazonsupply.com](http://www.amazonsupply.com)**



### **CULTIVO SOBRE LOS POLIURETANOS PCL/PEO-HMW**

Previamente a los cultivos, sobre las muestras de los poliuretanos PCL/PEO-HMW, se realiza una adsorción de fibronectina bovina (Sigma Aldrich), FN, utilizando una concentración de 20µg/mL en DPBS. Después se efectúa un lavado con DPBS. A continuación las muestras sobre los cubreobjetos se esterilizan por exposición a radiación UV durante 20 minutos estimando una baja degradación del RSD, y debido a la imposibilidad de esterilizar por otros medios. Para estos cultivos, se utiliza un medio de cultivo suplementado con 10% de FBS, 1% de P/S, glicerofosfato sódico 2mM y 50µg/mL ácido ascórbico con el objeto de inducir la diferenciación osteoblástica.

- Las células se siembran sobre los materiales en una placa multipocillo P24 utilizando aproximadamente 50.000células/pocillo, adicionando 500µL de suspensión celular por pocillo.
- Se deja en cultivo el tiempo deseado (4 días, 7 días o 14 días)

### **Proliferación (*Alamar Blue*)**

La proliferación celular se estudia mediante un método colorimétrico usando *Alamar Blue*. Este compuesto azul es degradado a un compuesto rosa por la actividad metabólica de las células.

- En el tiempo requerido, se retira el medio de cultivo y lava el pocillo con DPBS.

- Se retira el DPBS y añadió  $1\text{mL}$  por pocillo de medio sin rojo fenol, y suplementado con un 10% de FBS y *Alamar Blue* en proporción 1:10.
- Se incuba el cultivo a  $37^{\circ}\text{C}$  durante  $8\text{h}$ , y a continuación se sacan tres alícuotas de cada pocillo y se colocan en una placa P96.
- Se lee la absorbancia a  $570\text{nm}$  mediante un lector de placas VICTOR<sup>3</sup><sub>TM</sub> (Perkin Elmer).

### Diferenciación (ALP)

La fosfata alcalina, ALP, es una enzima producida por los osteoblastos, y se encuentra localizada fuera en la membrana celular y en la membrana de las vesículas precursoras de la mineralización (producidas a partir del citoplasma celular); su presencia es indicadora de la diferenciación osteoblástica (Golub *et al.* 2007). Para la evaluación de la diferenciación, se realiza un ensayo de cuantificación de la actividad de la ALP, mediante el método del p-NitrofenilFosfato, pNPP; en este método el pNPP es transformado en p-Nitrofenol, de color amarillo, bajo la acción de la citada enzima. Así, la actividad de la ALP se relaciona con el grado de diferenciación alcanzado por los osteoblastos. El procedimiento se describe a continuación.

- Al terminar el periodo de cultivo, se retira el medio y lava el pocillo utilizando DPBS.
- Se cambian las muestras de pocillo para evitar tomar en cuenta la señal de las células adheridas en el fondo.
- Se adicionan  $200\text{mL}$  de tampón de lisis (0,2% Triton X100 en tampón de Tris  $10\text{mM}$  y  $\text{pH}=7,2$ ) en un baño de hielo, y se incuba durante  $10\text{min}$ . Se utiliza hielo para evitar la degradación de las proteínas
- La placa se agita mediante un sonicador durante 2 minutos para ayudar a la lisis celular. Lisis es el rompimiento de la membrana celular
- Se toman  $100\mu\text{L}$  del lisado y mezclan en un microtubo con igual cantidad de reactivo pNPP a  $1\text{mg/mL}$  en un tampón de reacción, que contiene  $1\text{mM}$  de cloruro de magnesio y 0,037% de glicina.
- Se incuba durante  $2\text{h}$  a  $37^{\circ}\text{C}$  y protegido de la luz (el reactivo pNPP es fotosensible) y a continuación se detiene la reacción usando  $50\mu\text{L}$  de hidróxido sódico  $1\text{M}$ .
- La curva de calibración se realiza diluyendo un patrón de p-Nitrofenol en hidróxido sódico  $0,2\text{M}$  en diferentes concentraciones.
- Por último, se transvasan 2 alícuotas de cada muestra a una placa P96 y se lee la absorbancia en el lector de placas VICTOR<sup>3</sup><sub>TM</sub> a  $405\text{nm}$ .



---

## Inmunofluorescencia

- Al cabo del periodo de cultivo, las muestras se fijan con formalina durante 1h a 4°C.
- Se realiza un lavado con DPBS y las células son permeabilizadas con 0,5% Triton X100 en HEPES buffer con 10% de sucrosa.
- Se bloquea la adsorción inespecífica del anticuerpo utilizando albumina bovina a 1% en PBS (PBSA 1%)
- Se incuban las muestras con el anticuerpo primario contra colágeno I (Bionova, dilución 1:100) o contra osteocalcina (Abcam, dilución 1:200) diluido en PBSA 1% durante 1h a 4°C. Los anticuerpos son fabricados por los organismos vivos en respuesta a la presencia de alguna sustancia que reconocen como “no-yo”; el sitio molecular que reconoce el anticuerpo se llama antígeno.
- Se lavan las muestras con PBS + 0,5% (v/v) Tween 20 durante 5 minutos, dos veces.
- Se vuelve a bloquear 10 minutos con PBSA 1%
- Se incuban las muestras con el anticuerpo secundario Alexa 555 contra conejo (Invitrogen, dilución 1:400), Bodipy® *Phalloidin* conjugada a FITC (Invitrogen, 1:200) y 4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI (Sigma, 5µg/mL) durante 1h a 4°C. Alexa 555 es un anticuerpo conjugado con fluoruro que detecta el anticuerpo primario (Bionova o Abcam) con lo que se consigue teñir de rojo la proteína. Bodipy® *Phalloidin* está basado en una toxina proveniente del hongo *amanita phalloides* y que tiene afinidad por la actina, tiéndola de verde; la actina es la proteína que constituye la mayor parte del citoesqueleto de la célula. DAPI es un colorante que tiene afinidad por el ADN, y en consecuencia tiñe los núcleos de las células de un color azul.
- Se lavan las muestras con PBS + 0,5% v/v Tween 20 durante 5 minutos, dos veces.
- Se montan las muestras utilizando medio de montaje casero basado en Mowiol® y glicerol, suplementado con *p-Phenylenediamine*, PPD, para mantener la fluorescencia. Por último se observan en un microscopio de fluorescencia manteniendo los parámetros de adquisición fijos para luego comparar entre diferentes muestras.



## **B. ANEXO: PREPARACIÓN Y DEGRADACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE PLLA/PCL**

### **PREPARACIÓN DE MEMBRANAS POR *FREEZE EXTRACTION***

Según lo descrito por Lebourg y colaboradores (Lebourg *et al.* 2008) se utilizó: PLLA ( $\bar{M}_w=1,2\times 10^5$ ),  $\bar{M}_w/\bar{M}_n= 1,83$  y 99,6% de secuencias de ácido L-láctico (Cargill-Dow); PCL ( $\bar{M}_w=4,8\times 10^4$ ) (Polysciences); 1,4-Dioxano y etanol 98% fueron adquiridos de Scharlab. Las membranas fueron preparadas mediante extracción en frío o *freeze extraction* a partir de soluciones en Dioxano de PLLA/PCL en relaciones de 100/0, 80/20, 60/40, 40/60, 20/80 y 0/100 *w/w*. En resumen, estas soluciones fueron vaciadas dentro de moldes de Teflón y congeladas rápidamente en nitrógeno líquido obteniendo discos entre 1 y 3mm de espesor. A continuación estos discos fueron sumergidos en etanol a  $-10^\circ\text{C}$  durante dos días para extraer el dioxano; el etanol fue cambiado tres veces durante este periodo. Después, los discos fueron secados durante tres días y posteriormente almacenados en un ambiente seco con vasos desecantes. Muestras circulares de 6mm de diámetro fueron troqueladas y situadas en un ambiente seco hasta que los ensayos de degradación fueran llevados a cabo.

### **DEGRADACIÓN EN SOLUCIÓN BUFFER PBS**

El proceso de degradación también fue llevado a cabo para pellets de PLLA y PCL (reactivos originales) con fines comparativos con las membranas. Series de cinco muestras de 6mm fueron pesadas y ubicadas dentro de frascos con 20mL de solución buffer PBS (*Phosphate Buffer Saline*). Para permitir un completo llenado de la solución de PBS dentro de la estructura microporosa del PLLA y PCL, de naturaleza hidrofóbica, las membranas fueron sometidas a vacío para remover el aire hasta quedar totalmente sumergidas. El pH de la solución de PBS fue monitoreado y mantenido entre 7,0 y 7,4, cambiando el medio cada semana. Al terminar cada tiempo de programado (11, 33 y 65 semanas), las membranas fueron lavadas con agua destilada y luego sometidas a secado hasta peso constante. Las muestras degradadas fueron almacenadas en recipientes con atmósfera libre de humedad. La pérdida de masa fue determinada mediante gravimetría, utilizando una balanza con escala de 0,00001g. Los valores reportados corresponden al promedio de dos medidas.



# BIBLIOGRAFÍA

ABU-ID, M.H., *et al*, 2008. "Bis-Phosphy Jaws" - High and Low Risk Factors for Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaw. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, vol. 36, no. 2, pp. 95-103.

AFIFI-EFFAT, A.M. y HAY, J.N., 1972. Enthalpy and Entropy of Fusion and the Equilibrium Melting Point of Polyethylene Oxide. *J.Chem.Soc., Faraday Trans.2*, vol. 68, pp. 656-661.

ALIG, I., DUDKIN, S.M., JENNINGER, W. y MARZANTOWICZ, M., 2006. Ac Conductivity and Dielectric Permittivity of Poly (Ethylene Glycol) during Crystallization: Percolation Picture. *Polymer*, vol. 47, no. 5, pp. 1722-1731.

AL-KATTAN, A., *et al*, 2010. Medical Potentialities of Biomimetic Apatites through Adsorption, Ionic Substitution, and Mineral/Organic Associations: Three Illustrative Examples. *Advanced Engineering Materials*, vol. 12, no. 7, pp. B224-B233.

ALUOCH, A., TATINI, R., PARSONS, D.M. y SADIK, O., 2004. Stability Indicating ion-pair HPLC Method for the Determination of Risedronate in a Commercial Formulation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 27, no. 17, pp. 2799-2813.

AMATO, I., *et al*, 2007. Expression of Cell Adhesion Receptors in Human Osteoblasts Cultured on Biofunctionalized Poly-( $\epsilon$ -Caprolactone) Surfaces. *Biomaterials*, 9, vol. 28, no. 25, pp. 3668-3678 ISSN 0142-9612.

ASTM International., 2001. *D5155 01 Standard Test Methods for Polyurethane Raw Materials: Determination of the Isocyanate Content of Aromatic Isocyanates*.

AVAKIAN, P., STARKWEATHER JR., H.W. y KAMPERT, W.G., 2002. Chapter 4 Dielectric analysis of polymers. En: P.K. GALLAGHER ed., *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry. Applications to Polymers and Plastics* First ed. Elsevier Science B.V. *Chapter 4 Dielectric Analysis of Polymers*, pp. 147-165.

AVEROUS, L., MORO, L., DOLE, P. y FRINGANT, C., 2000. Properties of Thermoplastic Blends: Starch-polycaprolactone. *Polymer*, vol. 41, no. 11, pp. 4157-4167.

AYAD, S., *et al.*, 1998. Fibronectin. En: *The Extracellular Matrix Facts (Second Edition)* San Diego: Academic Press. *Fibronectin*, pp. 149-152.

AZIZIAN, S., 2004. Kinetic Models of Sorption: A Theoretical Analysis. *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 276, no. 1, pp. 47-52.

BAGDI, K., *et al*, 2012. Quantitative Estimation of the Strength of Specific Interactions in Polyurethane Elastomers, and their Effect on Structure and Properties. *European Polymer Journal*, vol. 48, no. 11, pp. 1854-1865.

BEAUMONT, R., *et al*, 1966. Heat Capacities of Propylene Oxide and of some Polymers of Ethylene and Propylene Oxides. *Polymer*, vol. 7, no. 8, pp. 401-417.

BELLIDO, T. y PLOTKIN, L.I., 2011. Novel Actions of Bisphosphonates in Bone: Preservation of Osteoblast and Osteocyte Viability. *Bone*, vol. 49, no. 1, pp. 50-55.

BOGDANOV, B., *et al*, 1998. Synthesis and Thermal Properties of Poly (Ethylene Glycol) - Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) Copolymers. *Polymer*, vol. 39, no. 8-9, pp. 1631-1636.

BOGDANOV, B., *et al*, 1999. Physical Properties of Poly (Ester-Urethanes) Prepared from Different Molar Mass Polycaprolactone-Diols. *Polymer*, vol. 40, no. 11, pp. 3171-3182.

BONZANI, I.C., *et al*, 2007. Synthesis of Two-Component Injectable Polyurethanes for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials*, vol. 28, no. 3, pp. 423-433.

BOSKEY, A.L., 2006. Chapter 12 - Mineralization, Structure and Function of Bone. En: M.J. SEIBEL, S.P. ROBINS y J.P. BILEZIKIAN eds., Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism (Second Edition) Burlington: Academic Press. *Chapter 12 - Mineralization, Structure and Function of Bone*, pp. 201-212.

BOSWORTH, L.A. y DOWNES, S., 2010. Physicochemical Characterisation of Degrading Polycaprolactone Scaffolds. *Polymer Degradation and Stability*, vol. 95, no. 2, pp. 2269-2276.

BOYER, R.F., 1968. Dependence of Mechanical Properties on Molecular Motion in Polymers. *Polymer Engineering & Science*, vol. 8, no. 3, pp. 161-185.

BROWN, J., *et al*, 2002. The Efficacy and Tolerability of Risedronate Once a Week for the Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. *Calcified Tissue International*, vol. 71, no. 2, pp. 103-111.

CALLEJA, R.D., *et al*, 1991. On the Dynamic Mechanical Behavior of Poly (Methyl Methacrylate) Reinforced with Kevlar Fibers. *Polymer Composites*, vol. 12, no. 6, pp. 428-435.

CARMAGNOLA, D., BERGLUNDH, T. y LINDHE, J., 2002. The Effect of a Fibrin Glue on the Integration of Bio-Oss® with Bone Tissue. *Journal of Clinical Periodontology*, vol. 29, no. 5, pp. 377-383.

---

CASPER, M., *et al*, 2010. Tissue Engineering of Cartilage using Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) Nanofiber Scaffolds Seeded *in Vivo* with Periosteal Cells. *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 18, no. 7, pp. 981-991.

CHAN-PARK, M.B., ZHU, A.P., SHEN, J.Y. y FAN, A.L., 2004. Novel Photopolymerizable Biodegradable Triblock Polymers for Tissue Engineering Scaffolds: Synthesis and Characterization. *Macromolecular Bioscience*, vol. 4, no. 7, pp. 665-673.

CHAUSSON, M., 2008. Block Copolymers of the Type Poly (Caprolactone) - b - Poly (Ethylene Oxide) for the Preparation and Stabilization of Nanoemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 362, no. 1-2, pp. 153-162.

CHUANG, W., JENG, U., SHEU, H. y HONG, P., 2006. Competition between Phase Separation and Crystallization in a PCL/PEG Polymer Blend Captured by Synchronized SAXS, WAXS, and DSC. *Macromolecular Research*, vol. 14, no. 1, pp. 45-51.

CIAPETTI, G., *et al*, 2003. Osteoblast Growth and Function in Porous Poly  $\epsilon$ -Caprolactone Matrices for Bone Repair: A Preliminary Study. *Biomaterials*, vol. 24, no. 21, pp. 3815-3824.

COMETA, S., 2010. Hydrolytic and Microbial Degradation of Multi-Block Polyurethanes Based on Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone)/poly (Ethylene Glycol) Segments. *Polymer Degradation and Stability*, vol. 95, no. 10, pp. 2013-2021.

COMETA, S., *et al*, 2010. Surface Segregation Assessment in Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) - Poly (Ethylene Glycol) Multiblock Copolymer Films. *Macromolecular Bioscience*, vol. 10, no. 3, pp. 317-327.

CZURYSZKIEWICZ, T., AREVA, S., HONKANEN, M. y LINDÉN, M., 2005. Synthesis of sol-gel Silica Materials Providing a Slow Release of Biphosphonate. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 254, no. 1, pp. 69-74.

DA SILVA, M.L.A., *et al*, 2010. Cartilage Tissue Engineering using Electrospun PCL Nanofiber Meshes and MSCs. *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 12, pp. 3228-3236.

DANESIN, R., *et al*, 2012. Self-Assembling Peptide-Enriched Electrospun Polycaprolactone Scaffolds Promote the h-Osteoblast Adhesion and Modulate Differentiation-Associated Gene Expression. *Bone*, vol. 51, pp. 851-859.

DAVIS, F.J., 2004. *Polymer Chemistry: A Practical Approach (First Edition)*. OUP Oxford.

DI LORENZO, M.L., COCCA, M. y MALINCONICO, M., 2011. Crystal Polymorphism of Poly (L-Lactic Acid) and its Influence on Thermal Properties. *Thermochimica Acta*, vol. 522, no. 1-2, pp. 110-117.

DOMINGOS, M., *et al*, 2010. Evaluation of in Vitro Degradation of PCL Scaffolds Fabricated Via Bioextrusion. Part 1: Influence of the Degradation Environment. *Virtual and Physical Prototyping*, vol. 5, no. 2, pp. 65-73.

FENG, N., *et al*, 2008. Oridonin-Loaded Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone)-Poly (Ethylene Oxide)-Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) Copolymer Nanoparticles: Preparation, Characterization, and Antitumor Activity on Mice with Transplanted Hepatoma. *Journal of Drug Targeting*, vol. 16, no. 6, pp. 479-485.

FLEISCH, H., RESZKA, A., RODAN, G. y ROGERS, M., 2002. Chapter 78 - Bisphosphonates: Mechanisms of Action. En: J.P. BILEZIKIAN, L.G. RAISZ y G.A. RODAN eds., Principles of Bone Biology (Second Edition) San Diego: Academic Press. *Chapter 78 - Bisphosphonates: Mechanisms of Action*, pp. 1361-XLIII.

FU, H., *et al*, 2011. Preparation and Tunable Temperature Sensitivity of Biodegradable Polyurethane Nanoassemblies from Diisocyanate and Poly (Ethylene Glycol). *Soft Matter*, vol. 7, pp. 3546-2552.

GARCIA-GIRALT, N., *et al*, 2008. A Porous PCL Scaffold Promotes the Human Chondrocytes Redifferentiation and hyaline-specific Extracellular Matrix Protein Synthesis. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 85, no. 4, pp. 1082-1089.

GOKHALE, J.A., BOSKEY, A.L. y ROBEY, P.G., 2001. Chapter 4 - The Biochemistry of Bone. En: R. MARCUS, D. FELDMAN y J. KELSEY eds., Osteoporosis (Second Edition) San Diego: Academic Press. *Chapter 4 - the Biochemistry of Bone*, pp. 107-188.

GOLUB, E.E. y BOESZE-BATTAGLIA, K., 2007. The Role of Alkaline Phosphatase in Mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics*, vol. 18, no. 5, pp. 444-448.

GÓMEZ RIBELLES, J., *et al*, 1992. Relaxation Spectra of Polymer Composites: The Main Relaxation in Poly (Methyl Acrylate) Reinforced with Continuous Kevlar Aramid Fibres. *Plastics Rubber and Composites Processing and Applications*, vol. 18, no. 3, pp. 169-179.

GUAN, J. y WAGNER, W.R., 2005. Synthesis, Characterization and Cytocompatibility of Polyurethane Urea Elastomers with Designed Elastase Sensitivity. *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 5, pp. 2833-2842.

HAYES, W.C., 1972. A Mathematical Analysis for Indentation Tests of Articular Cartilage. *Journal of Biomechanics*, vol. 5, no. 5, pp. 541-551.



---

HU, Y., *et al*, 2003. Preparation and Drug Release Behaviors of Nimodipine-Loaded Poly (Caprolactone) – Poly (Ethylene Oxide) – Polylactide Amphiphilic Copolymer Nanoparticles. *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2395-2404.

HUBBELL, J.A., 2007. Chapter 21 - Matrix effects. En: R. LANZA, R. LANGER y J. VACANTI eds., Principles of Tissue Engineering (Third Edition) Burlington: Academic Press. *Chapter 21 - Matrix Effects*, pp. 297-308.

IM, G., *et al*, 2004. Osteoblast Proliferation and Maturation by Bisphosphonates. *Biomaterials*, vol. 25, no. 18, pp. 4105-4115.

IZQUIERDO, R., *et al*, 2008. Biodegradable PCL Scaffolds with an Interconnected Spherical Pore Network for Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 85, no. 1, pp. 25-35.

JEONG, H.M., *et al*, 2013. Risedronate Increases Osteoblastic Differentiation and Function through connexin43. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 432, no. 1, pp. 152-156.

JIA, H.J., LI, W. y ZHAO, K., 2006. Determination of Risedronate in Rat Plasma Samples by Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography with UV Detector. *Analytica Chimica Acta*, vol. 562, no. 2, pp. 171-175.

JIANG, X., *et al*, 2007. Synthesis and Degradation of Nontoxic Biodegradable Waterborne Polyurethanes Elastomer with Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) and Poly (Ethylene Glycol) as Soft Segment. *European Polymer Journal*, vol. 43, no. 5, pp. 1838-1846.

JIN, X., ZHANG, S. y RUNT, J., 2002. Observation of a Fast Dielectric Relaxation in Semi-Crystalline Poly (Ethylene Oxide). *Polymer*, vol. 43, no. 23, pp. 6247-6254.

LE NIHOUANNEN, D., *et al*, 2008. Bone Tissue Formation in Sheep Muscles Induced by a Biphasic Calcium Phosphate Ceramic and Fibrin Glue Composite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 19, no. 2, pp. 667-675.

LEBOURG, M., ANTON, J.S. y RIBELLES, J., 2008. Porous Membranes of PLLA-PCL Blend for Tissue Engineering Applications. *European Polymer Journal*, vol. 44, no. 7, pp. 2207-2218.

LI, S. y VERT, M., 1995. Biodegradation of aliphatic polyesters. En: S. G ed., Degradable Polymers (Second Edition) Kluwer Academic Publishers. *Biodegradation of Aliphatic Polyesters*, pp. 71-141.

LIAN, J.B. y STEIN, G.S., 1992. Concepts of Osteoblast Growth and Differentiation: Basis for Modulation of Bone Cell Development and Tissue Formation. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, vol. 3, no. 3, pp. 269-305.

LIU, C.B., *et al*, 2008. Thermoreversible gel-sol Behavior of Biodegradable PCL-PEG-PCL Triblock Copolymer in Aqueous Solutions. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 84, no. 1, pp. 165-175.

LIU, H., 2010. Weight Loss and Morphology Changes of Electrospun Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) Yarns during *in Vitro* Degradation. *Fibers and Polymers*, vol. 11, no. 7, pp. 1024-1031.

LIU, L., FISHMAN, M.L., HICKS, K.B. y LIU, C.-., 2005. Biodegradable Composites from Sugar Beet Pulp and Poly (Lactic Acid). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 23, pp. 9017-9022.

LOH, X.J., COLIN SNG, K.B. y LI, J., 2008. Synthesis and Water-Swelling of Thermo-Responsive Poly (Ester Urethanes) Containing Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone), Poly (Ethylene Glycol) and Poly (Propylene Glycol). *Biomaterials*, 8, vol. 29, no. 22, pp. 3185-3194.

MA, Z., GAO, C., GONG, Y. y SHEN, J., 2003. Paraffin Spheres as Porogen to Fabricate Poly (L-lactic Acid) Scaffolds with Improved Cytocompatibility for Cartilage Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 67, no. 1, pp. 610-617.

MARK, J., 1999. Polymer Data Handbook. *Oxford University Press, Inc.*

MARTIN, C., WINET, H. y BAO, J., 1996. Acidity Near Eroding Polylactide-Polyglycolide *in Vitro* and *in Vivo* in Rabbit Tibial Bone Chambers. *Biomaterials*, vol. 17, no. 24, pp. 2373-2380.

MONDAL, S. y MARTIN, D., 2012. Hydrolytic Degradation of Segmented Polyurethane Copolymers for Biomedical Applications. *Polymer Degradation and Stability*, vol. 97, no. 8, pp. 1553-1561.

NAGATA, M., 2006. Photocurable Biodegradable Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone)/poly (Ethylene Glycol) Multiblock Copolymers Showing Shape-Memory Properties. *Colloid and Polymer Science*, vol. 284, no. 4, pp. 380-386.

NAM, Y.S. y PARK, T.G., 1999. Biodegradable Polymeric Microcellular Foams by Modified Thermally Induced Phase Separation Method. *Biomaterials*, vol. 20, no. 19, pp. 1783-1790.

---

NAMPOOTHIRI, K.M., NAIR, N.R. y JOHN, R.P., 2010. An Overview of the Recent Developments in Polylactide (PLA) Research. *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 22, pp. 8493-8501.

NOJIMA, S., ONO, M. y ASHIDA, T., 1992. Crystallization of Block Copolymers II. Morphological Study of Poly (Ethylene Glycol) - Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) Block Copolymers. *Polymer Journal*, vol. 24, no. 11, pp. 1271-1280.

OGATA, N., KAWAKAGE, S. y OGIHARA, T., 1997. Structure and thermal/mechanical Properties of Poly (Ethylene Oxide)-Clay Mineral Blends. *Polymer*, vol. 38, no. 20, pp. 5115-5118.

PAINTER, P.C. y COLEMAN, M.M., 1997. *Fundamentals of Polymer Science (Second Edition)*. Technomic.

PANT, H.R., *et al*, 2011. Fabrication of Highly Porous Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) Fibers for Novel Tissue Scaffold Via Water-Bath Electrospinning. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 88, no. 2, pp. 587-592.

PAPAPOULOS, S.E., 2001. Chapter 72 - Bisphosphonates in the Management of Postmenopausal Osteoporosis. En: R. MARCUS, D. FELDMAN y J. KELSEY eds., Osteoporosis (Second Edition) San Diego: Academic Press. *Chapter 72 - Bisphosphonates in the Management of Postmenopausal Osteoporosis*, pp. 631-650.

PEÑA, J., *et al*, 2006. Long Term Degradation of Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) Films in Biologically Related Fluids. *Polymer Degradation and Stability*, vol. 91, no. 7, pp. 1424-1432.

PETROVA, S., MILOSHEV, S., MATEVA, R. y ILIEV, I., 2008. Synthesis of Amphiphilic PEG-PCL-PEG Triblock Copolymers. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, vol. 43, no. 2, pp. 199-204.

PREECHATIWONG, W. y SCHULTZ, J.M., 1996. Electrical Conductivity of Poly (Ethylene Oxide)—alkali Metal Salt Systems and Effects of Mixed Salts and Mixed Molecular Weights. *Polymer*, vol. 37, no. 23, pp. 5109-5116.

PYDA, M., BOPP, R.C. y WUNDERLICH, B., 2004. Heat Capacity of Poly (Lactic Acid). *Journal of Chemical Thermodynamics*, vol. 36, no. 9, pp. 731-742.

QIAN, H., BEI, J. y WANG, S., 2000. Synthesis, Characterization and Degradation of ABA Block Copolymer of L-Lactide and  $\epsilon$ -Caprolactone. *Polymer Degradation and Stability*, vol. 68, no. 3, pp. 423-429.

QIU, Z., IKEHARA, T. y NISHI, T., 2003. Miscibility and Crystallization of Poly (Ethylene Oxide) and Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) Blends. *Polymer*, vol. 44, no. 10, pp. 3101-3106.

RADHAKRISHNAN, S. y VENKATACHALAPATHY, P., 1996. Effect of Casting Solvent on the Crystallization in PEO/PMMA Blends. *Polymer*, vol. 37, no. 16, pp. 3749-3752.

RASAL, R.M., JANORKAR, A.V. y HIRT, D.E., 2010. Poly (Lactic Acid) Modifications. *Progress in Polymer Science*, vol. 35, no. 3, pp. 338-356.

RECHICHI, A., *et al*, 2008. Degradable Block Polyurethanes from Nontoxic Building Blocks as Scaffold Materials to Support Cell Growth and Proliferation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 84, no. 4, pp. 847-855.

REIJENGA, J.C., KINGMA, W.J., BEREK, D. y HUTTA, M., 2007. GPCSIM - an Instrument Simulator of Polymer Analysis by Size Exclusion Chromatography for Demonstration and Training Purposes. *Acta Chimica Slovenica*, vol. 54, no. 1, pp. 79-87.

REILLY, G.C. y ENGLER, A.J., 2010. Intrinsic Extracellular Matrix Properties Regulate Stem Cell Differentiation. *Journal of Biomechanics*, vol. 43, no. 1, pp. 55-62.

RODAN, G.A. y FLEISCH, H.A., 1996. Bisphosphonates: Mechanisms of Action. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 97, no. 12, pp. 2692.

ROLAND, C., 1999. Chapter 15. Dynamic mechanical analysis of elastomers. En: P.K. GALLAGHER ed., *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry. From Macromolecules to Man (First Edition)* Elsevier. *Chapter 15. Dynamic Mechanical Analysis of Elastomers*, pp. 811-828.

SABATER I SERRA, R., *et al*, 2007. Dielectric Relaxation Spectrum of Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) Networks Hydrophilized by Copolymerization with 2-Hydroxyethyl Acrylate. *The European Physical Journal E: Soft Matter and Biological Physics*, vol. 22, no. 4, pp. 293-302.

SABATER I SERRA, R., *et al*, 2009. Segmental Dynamics in Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone)/poly (L-lactide) Copolymer Networks. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, vol. 47, no. 2, pp. 183-193.

SAHA, S.K. y TSUJI, H., 2006. Effects of Rapid Crystallization on Hydrolytic Degradation and Mechanical Properties of Poly (L-Lactide-Co- $\epsilon$ -Caprolactone). *Reactive and Functional Polymers*, vol. 66, no. 11, pp. 1362-1372.

SAHANA, H., *et al*, 2013. Improvement in Bone Properties by using Risedronate Adsorbed Hydroxyapatite Novel Nanoparticle Based Formulation in a Rat Model of Osteoporosis. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 9, no. 2, pp. 193-201.

SALMERÓN, M., RIBELLES, J.L.G., HERNÁNDEZ, F. y MANO, J.F., 2005. On the Kinetics of Melting and Crystallization of Poly (L-Lactic Acid) by TMDSC. *Thermochimica Acta*, vol. 430, no. 12, pp. 201-210 ISSN 0040-6031.

SALMERÓN, M., RIBELLES, J., MATHOT, V. y POEL, G., 2007. Effect of the Cooling Rate on the Nucleation Kinetics of Poly (L-Lactic Acid) and its Influence on Morphology. *Macromolecules*, vol. 40, no. 22, pp. 7989-7997.

SALTZMAN, W.M., 2000. Chapter 19 - Cell Interactions with Polymers. En: R.P. LANZA , R. LANGER y J. VACANTI eds., Principles of Tissue Engineering (Second Edition) San Diego: Academic Press. *Chapter 19 - Cell Interactions with Polymers*, pp. 221-235.

SCHAGEMANN, J., *et al*, 2010. Poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/gel Hybrid Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 93, no. 2, pp. 454-463.

SHAHIN, M. y LAVASANIFAR, A., 2010. Novel Self-Associating Poly (Ethylene Oxide)-*b*-Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) Based Drug Conjugates and Nano-Containers for Paclitaxel Delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 389, no. 1, pp. 213-222.

SHI, X., JIANG, J., SUN, L. y GAN, Z., 2011. Hydrolysis and Biomineralization of Porous PLA Microspheres and their Influence on Cell Growth. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 85, no. 1, pp. 73-80 ISSN 09277765.

SHKAPENKO, G., GMITTER, G. y GRUBER, E., 1960. Mechanism of the Water-Isocyanate Reaction. *Industrial & Engineering Chemistry*, vol. 52, no. 7, pp. 605-608.

SHOKROLLAHI, P., MIRZADEH, H., SCHERMAN, O.A. y HUCK, W.T.S., 2010. Biological and Mechanical Properties of Novel Composites Based on Supramolecular Polycaprolactone and Functionalized Hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 95, no. 1, pp. 209-221.

SOSNIK, A. y COHN, D., 2003. Poly (Ethylene Glycol)-Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) Block Oligomers as Injectable Materials. *Polymer*, vol. 44, no. 23, pp. 7033-7042.

SPERLING, L.H., 2005. *Introduction to Physical Polymer Science (Fourth Edition)*. Wiley-Interscience.

SPITZER, M., SABADINI, E. y LOH, W., 2002. Poly (Ethylene Glycol) Or Poly (Ethylene Oxide)?: Magnitude of End-Group Contribution to the Partitioning of Ethylene Oxide Oligomers and Polymers between Water and Organic Phases. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 13, no. 1, pp. 7-9.

TODO, M., PARK, S.D., TAKAYAMA, T. y ARAKAWA, K., 2007. Fracture Micromechanisms of Bioabsorbable PLLA/PCL Polymer Blends. *Engineering Fracture Mechanics*, vol. 74, no. 12, pp. 1872-1883.

TSUJI, H. e IKADA, Y., 1995. Blends of Isotactic and Atactic Poly (Lactide). I. Effects of Mixing Ratio of Isomers on Crystallization of Blends from Melt. *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 58, no. 10.

TSUJI, H. e IKADA, Y., 1998. Blends of Aliphatic Polyesters. II. Hydrolysis of solution-cast Blends from Poly (L-lactide) and Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) in phosphate-buffered Solution. *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 67, no. 3, pp. 405-415.

TSUJI, H. e IKADA, Y., 2000. Properties and Morphology of Poly (L-Lactide) 4. Effects of Structural Parameters on Long-Term Hydrolysis of Poly (L-Lactide) in Phosphate-Buffered Solution. *Polymer Degradation and Stability*, vol. 67, no. 1, pp. 179-189.

TSUJI, H., MIZUNO, A. e IKADA, Y., 2000. Properties and Morphology of Poly (L-Lactide). III. Effects of Initial Crystallinity on Long-Term in Vitro Hydrolysis of High Molecular Weight Poly (L-Lactide) Film in Phosphate-Buffered Solution. *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 77, no. 7, pp. 1452-1464.

TSUJI, H., *et al*, 2005. Hydrolytic Degradation of Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) in the Melt. *Polymer Degradation and Stability*, vol. 89, no. 2, pp. 336-343.

TSUJI, H., *et al*, 2008. Comparative Study on Hydrolytic Degradation and Monomer Recovery of Poly (L-Lactic Acid) in the Solid and in the Melt. *Polymer Degradation and Stability*, vol. 93, no. 10, pp. 1956-1963.

TSUJI, H., KAMO, S. y HORRI, F., 2010. Solid-State C-13 NMR Analyses of the Structures of Crystallized and Quenched Poly(Lactide)s: Effects of Crystallinity, Water Absorption, Hydrolytic Degradation, and Tacticity. *Polymer*, vol. 51, no. 10, pp. 2215-2220.

VAN KREVELEN, D.W. y TE NIJENHUIS, K., 2009. Chapter 6 - Transition Temperatures. En: *Properties of Polymers (Fourth Edition)* Amsterdam: Elsevier. *Chapter 6 - Transition Temperatures*, pp. 129-188.

VERMETTE, P., GRIESSER, H.J., LAROCHE, G. y GUIDOIN, R., 2001. *Biomedical Applications of Polyurethanes*. Landes Bioscience Georgetown, TX.

- VERTUCCIO, L., GORRASI, G., SORRENTINO, A. y VITTORIA, V., 2009. Nano Clay Reinforced PCL/starch Blends obtained by High Energy Ball Milling. *Carbohydrate Polymers*, vol. 75, no. 1, pp. 172-179.
- VIEIRA, A.C., *et al*, 2011. Mechanical Study of PLA-PCL Fibers during *in Vitro* Degradation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 4, no. 3, pp. 451-460.
- WANG, L., MA, W., GROSS, R. y MCCARTHY, S., 1998. Reactive Compatibilization of Biodegradable Blends of Poly (Lactic Acid) and Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone). *Polymer Degradation and Stability*, vol. 59, no. 1-3, pp. 161-168.
- WANG, Y., RIBELLES, J.L.G., SALMERÓN SÁNCHEZ, M. y MANO, J.F., 2005. Morphological Contributions to Glass Transition in Poly (L-Lactic Acid). *Macromolecules*, vol. 38, no. 11, pp. 4712-4718.
- WEI, X., *et al*, 2009a. Biodegradable Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) - Poly (Ethylene Glycol) Copolymers as Drug Delivery System. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 381, no. 1, pp. 1-18.
- WEI, X., *et al*, 2009b. Self-Assembled Honokiol-Loaded Micelles Based on Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) - Poly (Ethylene Glycol) - Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) Copolymer. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 369, no. 1-2, pp. 170-175.
- WINGKONO, G. y MEREDITH, C., 2008. Chapter 18. Optimization of Microdomain Structure to Control Osteoblast Attachment on Poly (ethylene glycol)-Poly (caprolactone) Polyurethanes. En: A. MAHAPATRO y A.S. KULSHESTHA eds., *Polymers for Biomedical Applications*. ACS Symposium Series ACS Publications. *Chapter 18. Optimization of Microdomain Structure to Control Osteoblast Attachment on Poly (Ethylene Glycol)-Poly (Caprolactone) Polyurethanes*, pp. 299-307.
- WOODRUFF, M.A. y HUTMACHER, D.W., 2010. The Return of a Forgotten Polymer - Polycaprolactone in the 21st Century. *Progress in Polymer Science*, vol. 35, no. 10, pp. 1217-1256.
- YADAV, A.K., *et al*, 2008. Preparation and Characterization of HA-PEG-PCL Intelligent Core-Corona Nanoparticles for Delivery of Doxorubicin. *Journal of Drug Targeting*, vol. 16, no. 6, pp. 464-478.
- YAM, W.Y., *et al*, 1999. Polymer Blends of Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) and Poly (Vinyl Methyl Ether) - Thermal Properties and Morphology. *Polymer*, vol. 40, no. 20, pp. 5545-5552.

YEN, M.S., 1997. PCL-PEC-PCL Triblock Copolydiol-Based Waterborne Polyurethane 1. Effects of the Soft-Segment Composition on the Structure and Physical Properties. *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 65, no. 5, pp. 883-892.

YU, F., *et al*, 2013. Plasticized-starch/poly (Ethylene Oxide) Blends Prepared by Extrusion. *Carbohydrate Polymers*, vol. 91, no. 1, pp. 253-261.

ZHANG, H., LIN, C.Y. y HOLLISTER, S.J., 2009. The Interaction between Bone Marrow Stromal Cells and RGD-Modified Three-Dimensional Porous Polycaprolactone Scaffolds. *Biomaterials*, vol. 30, no. 25, pp. 4063-4069.

ZHANG, W., *et al*, 2010. Amphiphilic Toothbrushlike Copolymers Based on Poly (Ethylene Glycol) and Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) as Drug Carriers with Enhanced Properties. *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 5, pp. 1331-1338.

ZHANG, X., ESPIRITU, M., BILYK, A. y KURNIAWAN, L., 2008. Morphological Behaviour of Poly (Lactic Acid) during Hydrolytic Degradation. *Polymer Degradation and Stability*, vol. 93, no. 10, pp. 1964-1970.

ZHAO, J., *et al*, 2003. Preparation and Characterization of Poly (L-lactide)/poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) Fibrous Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 91, no. 3, pp. 1676-1684.

ZHAO, Y., 2008. Effect of Functionalization of Multiwalled Nanotubes on the Crystallization and Hydrolytic Degradation of Biodegradable Poly (L-Lactide). *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 112, no. 51, pp. 16461-16468.

ZHOU, S., DENG, X. y YANG, H., 2003. Biodegradable Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) - Poly (Ethylene Glycol) Block Copolymers: Characterization and their use as Drug Carriers for a Controlled Delivery System. *Biomaterials*, vol. 24, no. 20, pp. 3563-3570.