

Síntesis, caracterización y aplicaciones biomédicas de redes de copolímeros basados en poliésteres

Tesis presentada por

Jorge Luis Escobar Ivirico

Para obtener el título de Doctor
por la Universidad Politécnica de Valencia,
Valencia, 2008

Directores de Tesis: Dr. Manuel Salmerón Sánchez
Dr. José Luis Gómez Ribelles

Miembros del tribunal

Dr. Manuel Monleón Pradas. Catedrático de Universidad, Departamento de Termodinámica Aplicada, Universidad Politécnica de Valencia, España.
(Presidente del tribunal)

Dra. Natália Maria de Araújo Alves: Profesora Asistente, Departamento de Ingeniería de Polímeros, Universidad de Minho, Braga, Portugal (Vocal).

Dra. Natalia García Giral, Investigadora, URFOA-IMIM, Hospital del Mar, Universidad Autónoma de Barcelona, España (Vocal).

Dr. Joao F. Mano, Profesor Asistente, Departamento de Ingeniería de Polímeros, Universidad de Minho, Braga, Portugal (Vocal)

Dr. José Antonio Gómez Tejedor, Titular de Universidad, Departamento de Física Aplicada, Facultad de Informática, Universidad Politécnica de Valencia, España (Secretario).

Suplentes:

Dr. Ivan Krakovský: Profesor Asociado, Charles University, Praga, República Checa.

Dra. Gloria Gallego Ferrer, Titular de Escuela Universitaria, profesora del Departamento de Termodinámica Aplicada, Universidad Politécnica de Valencia, España

Agradecimientos

Quisiera agradecer a la Generalitat Valenciana por su financiación a través de una beca FPI (CTBPRB/2005/075).

Agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia, a través de la financiación del proyecto de investigación científica y desarrollo tecnológico “MAT2003-05391-C03-01”, concedido al profesor José M^a. Meseguer Dueñas y con el cual se apoyó mi candidatura a la beca FPI de la Generalitat Valenciana

Agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia, a través de la financiación del proyecto de investigación científica y desarrollo tecnológico “DPI2007-65601-C03-03”, concedido al profesor Gloria Gallego Ferrer y del cual soy parte en estos momentos

Agradecer a los investigadores del 3B's Research Group in Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics, de Braga, Portugal y en especial al Profesor Joao F. Mano, por la ayuda y guía profesional durante mi estancia en dicho centro.

Agradecer al Centro de Investigaciones “Príncipe Felipe” por permitirme el uso de sus instalaciones.

Agradecer a mis compañeros y a los profesores del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular y en especial a mis tutores todas las enseñanzas brindadas a lo largo de estos años, el haberme acogido en el seno del centro y haberme permitido formar parte de éste bonito proyecto.

Agradecer a Juanchi, Ana, Josafat y Gema por ser mi familia en todo momento.

Agradecer a mi familia en general y en especial a mi madre que sin ella no estaría aquí hoy. Mamá gracias por ser la mejor madre del mundo.

Por último y muy especialmente a Dunia que lo es todo para mi, gracias por dejarme compartir de tu vida y por haberme dado la satisfacción de ser padre.

Índice

Resumen	8
1. Introducción	14
1.1. Objetivos	15
1.2. Reacciones de Polimerización. Antecedentes	16
1.2.1. Policondensación	18
1.2.1.1. Monómero	20
1.2.2. Polimerización por apertura de anillo (ROP)	21
1.2.2.1. ROP de los ésteres cíclicos	22
1.2.2.2. ROP catiónica	23
1.2.2.3. ROP aniónica	24
1.2.2.4. ROP de coordinación-inserción	25
1.2.2.5. Iniciadores	26
1.2.2.6. Monómeros	26
1.2.2.7. 2-etilhexanoato de estaño $[\text{Sn}(\text{Oct})_2]$	28
1.2.2.8. Reacciones de transesterificación	29
1.2.3. Polimerización por radicales libres	32
1.2.3.1. Iniciación	32
1.2.3.2. Propagación	34
1.2.3.3. Terminación	35
1.3. Poliésteres	36
1.3.1. Modificaciones de los poliésteres	37
1.3.2. Degradación de los poliésteres	38
1.3.3. Poliláctico. Estereoisómeros y degradación	39
1.3.4. Poli (ϵ -caprolactona). Características y degradación	41
1.3.5. Aplicaciones de los poliésteres	43

1.4. Ingeniería tisular.....	44
1.4.1. Scaffolds.....	47
1.4.2. Biomateriales utilizados en ingeniería de tejidos óseos.....	50
1.4.3. Aspectos fundamentales del tejido óseo.....	54
1.4.3.1. Constituyentes del tejido óseo.....	57
1.4.3.2. Las células óseas.....	58
2. Parte Experimental.....	62
2.1. Materiales.....	63
2.1.1. Monómeros.....	63
2.1.2. Iniciadores.....	64
2.1.3. Otros reactivos.....	64
2.1.4. Solventes.....	66
2.1.5. Células y medios utilizados en los cultivos.....	67
2.2. Técnicas experimentales.....	68
2.3. Sistemas poliméricos.....	72
2.3.1. Métodos 1. Obtención de redes de poli(CLMA-co-HEA)....	72
2.3.1.1. Copolimerización de CLMA con HEA.....	72
2.3.1.2. Preparación de los scaffolds de poli(CLMA-co-HEA).....	73
2.3.1.3. Cultivos celulares en los scaffolds de poli(CLMAco-HEA).....	74
2.3.2. Métodos 2. Redes de copolímeros de poli(mCL-co-HEA).....	78
2.3.2.1. Síntesis del macrómero de PCL (mCL).....	78
2.3.2.2. Redes de mCL.....	79
2.3.2.3. Redes de copolímeros de poli(mCL-co-HEA).....	80
2.3.2.4. Preparación de los scaffolds de p(mCL).....	80

2.3.3. Métodos 3. Redes de copolímeros de poli(mLA-co-HEA).....	81
2.3.3.1. Síntesis de poli(L-láctido) diol.....	81
2.3.3.2. Síntesis de un macrómero de poli(L-láctido) (mLA).....	83
2.3.3.3. Redes de homopolímero de mLA.....	86
2.3.3.4. Redes de copolímeros de poli(mLA-co-HEA).....	86
2.3.4. Métodos 4. Redes de copolímeros de mCL y mLA.....	87
2.3.4.1. Síntesis de redes copoliméricas de los macrómeros de mCL y mLA.....	87
3. Resultados y discusión.....	88
3.1. Desarrollo de nuevas redes a base de Caprolactona 2-(metacriloiloxi)etil éster (CLMA).....	89
3.1.1. Arquitectura y propiedades de scaffolds de pCLMA y p(CLMA-co-HEA)	104
3.1.2. Determinación de propiedades mecánicas de los scaffolds mediante ensayos de compresión.....	108
3.1.3. Estudio del comportamiento de las GBMCs “in vitro”.....	112
3.1.3.1. Adhesión, proliferación y diferenciación de las GBMCs en los scaffolds de poliCLMA y poli(CLMA-co-HEA).....	112
3.1.3.2. Osteoinducción.....	119
3.2. Síntesis de redes de copolímeros de poli(mCL-co-HEA)	122
3.2.1. Arquitectura de los scaffolds de poli(mCL).....	147
3.3. Síntesis de redes de L-láctido con hidrofiliidad controlada.....	148
3.3.1. Redes de poli(mLA) y de copolímeros de poli(mLA-co-	

HEA).....	154
3.4. Síntesis de redes a base de los macrómeros de L-láctido (mLA) y ε-caprolactona (mCL).....	170
4. Conclusiones.....	186
Abreviaturas.....	191
Referencias.....	194

Resumen

La ingeniería tisular es una ciencia multidisciplinaria que incluye tanto los principios fundamentales de la ingeniería de materiales como de la biología celular y molecular para dar lugar al desarrollo de tejidos y órganos artificiales. Específicamente, la ingeniería de tejido óseo ha estado a la vanguardia. La combinación de células osteoblásticas o en su defecto células capaces de diferenciarse en tejido óseo, unido a la presencia de moléculas bioactivas y materiales tridimensionales “scaffolds” hacen de ésta técnica una realidad en la regeneración y reparación del hueso. Es por ello que el gran reto de éste trabajo ha sido el desarrollo de nuevos materiales basados en cadenas poliméricas de poliésteres que puedan ser útiles en ésta aplicación. La incorporación de unidades hidrófilas en sus estructuras nos ha permitido disminuir el carácter hidrófobo y la alta cristalinidad de estos materiales permitiendo incluir en la lista de sus propiedades (biocompatibilidad, buenas propiedades mecánicas, etc.) la capacidad de absorber agua de forma controlada, sin perder la buena adhesión celular que presentan, aumentar su velocidad de degradación y que como objetivo final pudieran ser utilizados en ingeniería tisular. En este sentido, se sintetizaron y caracterizaron los copolímeros de caprolactona 2-(metacrililoiloxi) etil ester (CLMA) con acrilato de 2-hidroxietilo (HEA) en diferentes proporciones con el objetivo de obtener materiales con hidrofiliidad controlada. Se prepararon scaffolds de estructura de poros interconectados y se realizaron cultivos de células mesenquimales provenientes de médula ósea de cabras, diferenciadas a tejido óseo, con resultados satisfactorios.

Debido a que las unidades de ϵ -caprolactona en el material descrito no formaban parte de la cadena principal de los copolímeros, sintetizamos nuevos

materiales con éstas características. Se obtuvieron dos macrómeros a base de ϵ -caprolactona (mCL) y L-láctido (mLA), haciendo reaccionar la poli(ϵ -caprolactona) diol y el poli(L-láctido) diol con anhídrido metacrílico. Una vez obtenido fueron caracterizados, copolimerizados con unidades de HEA y analizada sus respectivas microestructuras.

Por último se sintetizaron copolímeros de ambos macrómeros (mCL y mLA). Se analizó la microestructura del nuevo sistema y se investigó la arquitectura de dichas redes.

Summary

Tissue engineering consists of a multidisciplinary science that includes the fundamental principles of the materials engineering and molecular biology giving rise to the development of tissue and artificial organs. Specifically, bone tissue engineering has been the vanguard in this field. The combination of osteoblastic cells or in their defect cells that can be able to differentiate in bone tissue, together bioactive molecules and three-dimensional materials “scaffolds” makes of this technique a reality in bone repair and regeneration. It is the reason that the great challenge of this work has been the development of new materials based on polymeric polyester chains that can be useful in this application. The incorporation of hydrophilic units in its structures has allowed us to diminish the hydrophobic character and the high cristalinity of these materials, being allowed to include in the list of its properties (biocompatibility, good mechanical properties, etc.) the capacity to absorb water of controlled form, without lose the good cellular adhesion, increase its degradation rates and finally that the materials could be used in tissue engineering. In this sense, copolymers of caprolactone 2-(metacrililoixi) etil ester (CLMA) and 2-hydroxyethyl acrylate (HEA) with different contents were synthesized and characterized, seeking to improve the hydrophilicity of the system Also, we prepare scaffolds of this materials with interconnected pore structure and seeding on its goat marrow stromal cells differentiated to osteoblastic cells.

Because, ϵ -caprolactone units did not comprise of the principal copolymeric chain, we synthesize new materials with these characteristics. Macromers of ϵ -caprolactona (mCL) and L-lactic (mLA) were obtained through sterification reaction of poly(ϵ -caprolactone) diol and poly (L-lactic)

diol with methacrylic anhydride. The effective incorporation of the polymerizable end groups was assessed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and Nuclear Magnetic Resonance ($^1\text{H-NMR}$). The macromers were copolymerized with 2-hydroxyethyl acrylate (HEA) seeking to tailor the hydrophilicity of the systems.

On the other hand, copolymers of both macromers were obtained through radical copolymerization. The microstructure of the new systems and the network architecture were investigated.

Resum

L'enginyeria tissular és una ciència multidisciplinària que inclou tant els principis fonamentals de l'enginyeria de materials com de la biologia molecular, per a donar lloc al desenvolupament de teixits i òrgans artificials. Específicament, l'enginyeria de teixit ossi ha estat a l'avantguarda. La combinació de cèl·lules osteoblàstiques o, en defecte d'això, cèl·lules capaces de diferenciar-se en teixit ossi, unit a la presència de molècules bioactives i materials tridimensionals (esquelets, *scaffolds*) fan d'aquesta tècnica una realitat en la regeneració i reparació de l'os. És per això que el gran repte d'aquest treball ha estat el desenvolupament de nous materials basats en cadenes polimèriques de polièsters que puguin ser útils en aquesta aplicació. La incorporació d'unitats hidròfiles en les seues estructures ens ha permès disminuir el caràcter hidròfob i l'alta cristal·linitat d'aquests materials i ha permès incloure en la llista de les seues propietats (biocompatibilitat, bones propietats mecàniques, etc.) la capacitat d'absorbir aigua de forma controlada, sense perdre la bona adhesió cel·lular que presenten; augmentar la velocitat de degradació, i que, com a objectiu final, es pogueren utilitzar en enginyeria tissular. En aquest sentit, es van sintetitzar i caracteritzar els copolímers de caprolactona 2-(metacriloxi) etil èster (CLMA) amb acrilat de 2-hidroxiètilé (HEA) en diferents proporcions amb l'objectiu d'obtenir materials amb hidrofilitat controlada. Es van preparar esquelets d'estructura de porus interconnectats i es van realitzar cultius de cèl·lules mesenquimàtiques provinents de medul·la òssia de cabres, diferenciades en teixit ossi, amb resultats satisfactoris.

A causa del fet que les unitats de ϵ -caprolactona en el material descrit no

formaven part de la cadena principal dels copolímers, vam sintetitzar nous materials amb aquestes característiques. Es van obtenir dos macròmers a partir de ϵ -caprolactona (mCL) i L-làctic/ (mLA), fent reaccionar la poli- ϵ (caprolactona) diol i el poli (L-làctic/) diol amb anhídrid metacrílic. Una vegada obtingut, es van caracteritzar, copolimeritzar amb unitats de HEA i analitzar les seues respectives microestructures.

Finalment, es van sintetitzar copolímers d'ambdós macròmers (mCL i mLA). Es va analitzar la microestructura del nou sistema i es va investigar l'arquitectura d'aquestes xarxes.

Capítulo 1
Introducción

1.1. Objetivos

El presente documento plantea la síntesis, caracterización e hidrofiliación de nuevos macrómeros a base de ϵ -caprolactona y L-láctido, así como el estudio del comportamiento de células mesenquimales, proveniente de médula ósea de cabras (GBMCs) en materiales tridimensionales (scaffolds), con estructura de poros interconectados, en algunos de los materiales realizados. Para ello se planteó el siguiente objetivo:

1. Síntesis y caracterización de copolímeros de diferentes composiciones a base de caprolactona 2-(metacriloiloxi) etil éster (CLMA) con acrilato de 2-hidroxietilo (HEA), el desarrollo de scaffolds de estos materiales y su influencia en la diferenciación a tejido óseo de los cultivos de GBMCs.

Debido a que las unidades de ϵ -caprolactona no formaban parte de la cadena principal, solo de las cadenas laterales, sintetizamos un macrómero que tuviera ésta característica, además de obtener un material con una estructura química tetrafuncional capaz de reticular por sí mismo. Por otro lado, conociendo que la policaprolactona comercial presenta una degradación lenta y una cinética de absorción de agua muy baja, causado entre otras cosas por su alta cristalinidad, pues nos dimos a la tarea de variar estas características copolimerizándolo con un monómero de naturaleza hidrófila, el HEA, por lo que los objetivos principales en este bloque fueron:

1. Síntesis y caracterización tanto físico-química como mecánica de un macrómero a base de ϵ -caprolactona (mCL), mediante una reacción de esterificación entre la policaprolactona diol y el anhídrido metacrílico.
2. Hidrofiliación del sistema, mediante la reacción de copolimerización del mCL con HEA con diferentes composiciones.

1. Introducción

Por último nos propusimos obtener también un macrómero a base de L-láctido, con estructura química también tetrafuncional capaz de reticular por si mismo por lo que los objetivos del trabajo a realizar fueron:

1. Síntesis y caracterización tanto físico-química como mecánica de un macrómero de L-láctido (mLA) mediante dos pasos, el primero mediante la obtención del poli(L-láctido) diol debido a una reacción de apertura de anillo a partir del monómero de L-láctido y utilizando como catalizador el 2-etil-hexanoato de estaño, y el segundo paso, una reacción de esterificación entre el poli(L-láctido) diol obtenido y anhídrido metacrílico.
2. Obtención de materiales con hidrofiliidad controlada a partir de la reacción de copolimerización de mLA con HEA con diferentes composiciones.
3. Obtención de redes copoliméricas utilizando los dos macrómeros planteados (mLA y mCL), mediante copolimerización vía radical.
4. Caracterización físico-química como mecánica de los copolímeros a obtener.

1.2. Reacciones de Polimerización. Antecedentes.

Durante la pasada década, el campo de la ingeniería tisular adquirió gran importancia dentro de la investigación de los biomateriales, creciendo vertiginosamente hasta nuestros días no solo en interés sino también en la actividad de muchos centros científicos que han apostado por este campo. Las esperanzas de que los conceptos y las técnicas de la ingeniería tisular fueran aplicados a enfermedades humanas hicieron que empezaran a obtenerse resultados prometedores, conducidos por las profundas necesidades y el

potencial de esta nueva disciplina. Para llevar a cabo con éxito esta empresa, muchos investigadores han optado por el desarrollo de materiales diversos que de acuerdo a sus características puedan ser utilizados de una forma u otra. Se han utilizado materiales provenientes de fuentes naturales y materiales de origen sintético, no siendo mejores unos o los otros, sino que aprovechando cada una de sus características podamos poseer más herramientas para combatir muchas dolencias que aún hoy quedan sin resolver. Este es el caso de los poliésteres como por ejemplo la poli(ϵ -caprolactona), el poli(L-láctido), etc., que han sido muy estudiados y que son una alternativa por su potencial como polímeros biodegradables.

Muchos de los estudios de estos materiales han estado dirigidos hacia la síntesis de polímeros lineales como es el caso del estudio de la reacción entre octanoato de estaño (SnOct_2) y diferentes alcoholes, variando la estructura química de éste último y la temperatura de reacción [1], o estudiando otro tipo de catalizadores como es el caso del cinc bis(2,2-dimetil-3,5-heptanodionato-*O,O'*), ($\text{Zn}-(\text{Acac})_2$), para obtener mayores pesos moleculares en las polilactonas [2]. También se han estudiado estructuras poliméricas ramificadas en forma de estrella a base de poliésteres alifáticos, utilizando un mecanismo de coordinación-inserción [3], así como el uso de varios tipos de catalizadores para acelerar la reacción entre el L-láctido y el glicerol [4].

El proceso de entrecruzamiento de estos materiales ha recibido menos atención y es uno de los objetivos de este trabajo, ya que en muchas aplicaciones son más necesarios redes que polímeros lineales. Entre las nuevas aplicaciones [5-12] que pueden tener estos poliésteres entrecruzados están los implantes de scaffolds en defectos óseos, los cuales puedan gradualmente ser sustituidos por el tejido óseo durante el proceso de regeneración y la obtención de hidrogeles al copolimerizarlos con monómeros de naturaleza hidrófila.

1. Introducción

Una reacción de policondensación directa puede ser utilizada para introducir grandes cantidades de dobles enlaces que conlleven a una reacción de polimerización radical a lo largo de la cadena polimérica. El ácido fumárico y otros ácidos biocompatibles [12], intermediarios del ciclo de Krebs, han sido utilizados en la policondensación de biopolímeros [6]. Una alternativa a la policondensación directa es la preparación de prepolímeros y la funcionalización de sus grupos terminales. Varios autores han publicado las modificaciones en las estructuras químicas de la poli(ϵ -caprolactona), el poli(L-láctido) y el poli(glicólido) para la obtención de dioles, utilizando el ácido maleico [6], ácido fumárico [6], acrilatos [13] y (β -isocianatopropil) trietoxisilano [14]. También está reportado en la literatura el posible uso de anhídrido de ácido itacónico [15] y el anhídrido de ácido metacrílico [16], siendo éste último ampliamente utilizado en éste trabajo.

1.2.1. Policondensación

Las reacciones de policondensación han sido desde hace varias décadas la vía tradicional de obtención de poliésteres a partir de dioles, diácidos o derivados de ácidos e hidroxiácidos. No obstante, dicho método presenta una serie de inconvenientes como son las reacciones a elevadas temperaturas, largos tiempos de reacción, la necesidad de un balance estequiométrico entre el ácido y los grupos hidroxilos, etc. En este caso, la obtención de altas conversiones en la reacción, que nos permitan obtener cadenas poliméricas de alto peso molecular y le confieran a un posible producto unas buenas propiedades mecánicas son poco probables debido a efectos como las reacciones colaterales que puedan producirse y a la evaporación del monómero lo que conllevan a un desbalance estequiométrico entre los reaccionantes.

Varma y sus colaboradores [17-23] han reportado la obtención de copolímeros al azar de altos pesos moleculares no biodegradables de poli(etilen tereftalato) (PET) con tetra-/hexa-/octa-/ poli(etilen glicol) mediante el método de policondensación. Otros autores [24-26] han publicado diferentes estudios de copolímeros que contienen fracciones de poliésteres alifáticos y aromáticos y que combinan tanto sus propiedades mecánicas como degradativas.

Albertsson y Ljungquist [27], sintetizaron el poli(tetrametilen adipato) marcado con ^{14}C usando el ácido adípico, tetrametilenglicol y tetraisopropóxido de titanio como catalizadores. La reacción se llevó a cabo en ambiente de nitrógeno por varias horas a una temperatura de 190°C y una vez eliminada el agua de la reacción se bajó la temperatura hasta los $140\text{-}150^{\circ}\text{C}$. La mayor parte del tiempo la reacción se mantuvo a una temperatura de 165°C y a una presión de 1mm Hg, hasta la obtención de un producto muy viscoso.

Como hemos mencionado anteriormente, existen muchas dificultades para preparar polímeros de altos pesos moleculares por éste método, sin embargo se comercializan oligómeros con peso molecular de pocos miles. No obstante, se han publicado trabajos donde a partir de estos oligómeros se pueden obtener extensiones de diferentes tipos de cadenas mediante reacciones de policondensación como es el caso de hacer reaccionar el ácido octadecanodicarboxílico con la poli(caprolactona) diol y el producto obtenido con el cloruro de sebacoilo [28]. Por otro lado, en la figura 1.1 se representa la reacción de policondensación en la obtención de un oligómero de poli(1,3-propilen succinato) diol con un peso molecular promedio en número de $M_n=2200$ Da, utilizando una proporción molar entre el 1,3-propanodiol y el ácido succínico igual a 1.02 [29].

1.2.2. Polimerización por apertura de anillo (ROP)

La polimerización por apertura de anillo (ROP) de las lactonas y los diésteres cíclicos (láctidos y glicólidos) representa un método alternativo a la policondensación y ha sido utilizado con éxito en la obtención de polímeros de altos pesos moleculares, bajo condiciones de reacción relativamente suaves. Dicha reacción de poli-adición se lleva a cabo prácticamente con la ausencia de reacciones colaterales y siendo posible el control de varias propiedades como el peso molecular y la distribución de pesos moleculares del polímero resultante. La ROP de las lactonas y los láctidos ha sido ampliamente estudiada durante los últimos 40 años debido a su versatilidad en la producción de diferentes materiales con fines médicos. Carothers y sus colaboradores [33-36] fueron los primeros en explorar las técnicas de ROP para lactonas, anhídridos y carbonatos. Desde entonces éste método ha sido ampliamente aplicado a una gran diversidad de monómeros para producir todo tipo de polímeros ayudado por el desarrollo de iniciadores y catalizadores específicos de este tipo de reacción.

Existen muchas razones para el estudio de la polimerización de los ésteres cíclicos. Primero, para aprovechar el gran potencial de la química de los polímeros sintéticos, la cual nos permite preparar una gran variedad de éstos. Las condiciones experimentales deben ser optimizadas con el objetivo de obtener mayor eficiencia tecnológica en el proceso. La segunda razón para el estudio de ROP es que nos permite muchos avances en la obtención de macromoléculas con diferentes arquitecturas como por ejemplo, copolímeros en bloque, copolímeros de injerto, polímeros en forma de estrella, etc. Es posible estudiar las propiedades físico-químicas, mecánicas y los procesos de degradación de estos materiales para determinar la relación estructural-

1. Introducción

propiedades. La tercera razón para el estudio de este tipo de sistemas es que podemos obtener información tanto de la cinética [37] como de los mecanismos de polimerización [38] de estos materiales.

1.2.2.1. ROP de los ésteres cíclicos

Las polilactonas y los poliláctidos de alto peso molecular son exclusivamente producidos mediante ROP a partir de sus correspondientes monómeros cíclicos. El poliéster es obtenido cuando reaccionan el éster cíclico con el catalizador o el iniciador.

El siguiente esquema representa la síntesis mediante ROP de los ésteres cíclicos.

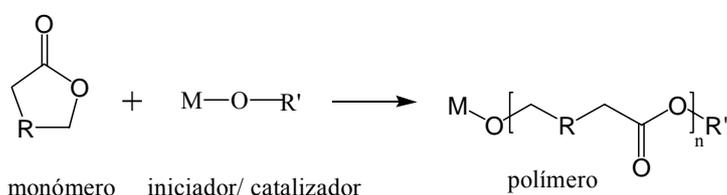


Figura 1.2. Representación esquemática de la ROP en ésteres cíclicos.
 $R=(CH_2)_{1-3}$ y/o (CHR'')

Cada macromolécula formada contiene generalmente un extremo de cadena con un grupo funcional originado por la reacción de terminación y otra con un grupo funcional proveniente del iniciador. Variando tanto el iniciador como el catalizador y las condiciones de terminación de la reacción, podemos obtener compuestos con grupos funcionales diversos que nos permitan utilizarlos en diferentes aplicaciones. El tipo de iniciador y los grupos funcionales finales de cadena juegan un importante papel en la estabilidad térmica e hidrolítica del poliéster resultante [39-41].

La ROP puede llevarse a cabo tanto en polimerización en masa como en solución, dispersión y emulsión [42,43]. El catalizador o iniciador es necesario para comenzar la polimerización. Se pueden obtener polímeros de alto peso molecular y de baja polidispersidad en períodos cortos de tiempo. Algunos problemas asociados a la policondensación tales como las altas temperaturas de reacción y la eliminación de productos de bajo peso molecular como el agua, no se presentan en ROP [44].

Dependiendo del iniciador, la polimerización procederá por tres diferentes mecanismos [45]: el catiónico, el aniónico y el de inserción-coordinación [46-48]. Existen otros como el mecanismo radical, zwitteriónico [49] o por hidrógenos activos que no son muy utilizados debido a la obtención de polímeros de muy bajo peso molecular.

1.2.2.2. ROP catiónica

Muchos de los ésteres cíclicos de 4-, 6- y 7- miembros dan lugar a poliésteres cuando reaccionan con catalizadores catiónicos [45, 50-52]. La ROP catiónica involucra la formación de especies de cargas positivas las cuales son consecutivamente atacadas por el monómero (figura 1.3). El ataque da como resultado la apertura del anillo de la especie cargada positivamente a través de un proceso de sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2).

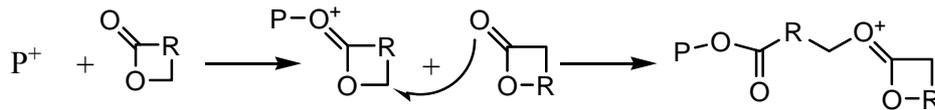


Figura 1.3. Mecanismo de ROP de un éster cíclico con iniciación catiónica.

1. Introducción

La polimerización catiónica es difícil de controlar y sólo se obtiene mediante este mecanismo polímeros de bajo peso molecular. Sólo se ha obtenido pesos moleculares de 10000 Da en el estudio tanto en polimerización en masa como en solución del 1,5-dioxapan-2-ona (DXO) mediante iniciación catiónica [50]. Otros detalles de este tipo de polimerización han sido publicados por Penczek y colaboradores [53,54].

1.2.2.3. ROP aniónica

La polimerización por apertura de anillo aniónica de monómeros de ésteres cíclicos tiene lugar por el ataque nucleofílico de las cargas negativas del iniciador sobre el carbono del carbonilo o sobre el átomo de carbono adyacente del oxígeno acilo, obteniéndose un poliéster lineal [55,56] (ver figura 1.4). Las especies que se propagan están cargadas negativamente y mantienen un balance con un ión positivo.

Dependiendo de la naturaleza de las cadenas terminales iónicas que se propagan y el solvente, el complejo reaccionante varía completamente de iónico a covalente.

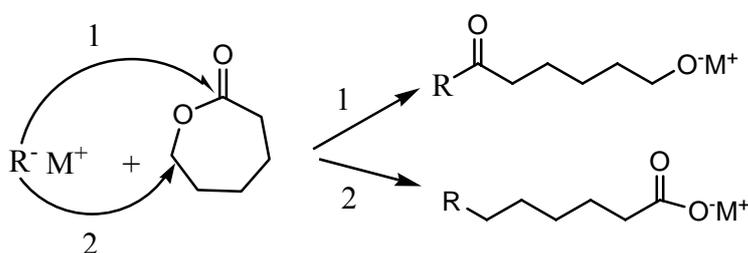


Figura 1.4. Mecanismo de ROP de un éster cíclico con iniciación aniónica. Apertura de anillo del monómero por: 1) ruptura del enlace entre el oxígeno y el grupo acilo o 2) debido a la ruptura del enlace entre el oxígeno y el grupo alquilo.

Uno de los mejores métodos para obtener polímeros de alto peso molecular se basa en la polimerización aniónica llevada a cabo en solventes polares. Jedlinski y colaboradores [57] desarrollaron el método de ROP aniónica viviente de anillos de lactona de 4- y 5- miembros y han descrito la obtención de polímeros y copolímeros de altos pesos moleculares. La ROP aniónica para anillos de 4 miembros (β -lactonas) ocurre a través de la ruptura del enlace entre el oxígeno y el grupo alquilo o el grupo acilo para dar lugar a los carboxilatos o los alcóxidos.

La ϵ -caprolactona y el láctido reaccionan únicamente por el ataque de un anión en el átomo de carbono del carbonilo, provocando la ruptura del enlace oxígeno-grupo acilo y la posterior formación del alcóxido como especie en crecimiento [58,59].

1.2.2.4. ROP de coordinación-inserción

La ROP pseudo-aniónica es a menudo llamada ROP de coordinación-inserción, ya que el proceso de propagación se piensa que procede por la coordinación del monómero con las especies activas, seguida por la inserción del monómero entre el enlace metal-oxígeno por la reorganización de los electrones [46,47]. La figura 1.5 muestra la representación esquemática del mecanismo de coordinación-inserción.

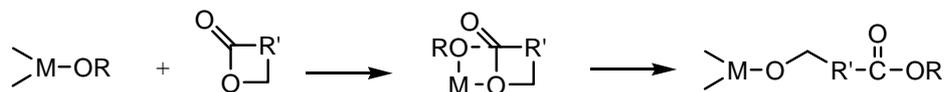


Figura 1.5. Mecanismo de ROP coordinación-inserción propuesto para un éster cíclico.

1. Introducción

En el mecanismo de ROP de coordinación-inserción las cadenas en crecimiento permanecen unidas al metal a través de un enlace alcóxido durante el proceso de propagación y la reacción termina por hidrólisis dando lugar a grupos hidroxilos terminales. La obtención del macrómero con grupos activos terminales es producida en la reacción de post-polimerización, mediante la sustitución del iniciador por el grupo alcóxido funcional.

1.2.2.5. Iniciadores

La síntesis de nuevos iniciadores que nos puedan servir en la ROP y la obtención de nuevos macrómeros con diferentes grupos funcionales, nos pueden ayudar en la preparación de novedosas estructuras macromoleculares. Una gran variedad de compuestos organometálicos como por ejemplo: los alcóxidos y carboxilatos metálicos han sido estudiados como iniciadores o catalizadores con el objetivo de alcanzar una síntesis efectiva de varios polímeros [60]. Existen muchas reacciones catalizadas por complejos de metales que son altamente específicas por la selección cuidadosa del metal y el ligando por las cuales podemos obtener las estructuras poliméricas deseadas [61,62]. Los alcóxidos metálicos unidos covalentemente reaccionan como iniciadores de coordinación y no como iniciadores aniónicos o catiónicos [63].

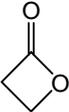
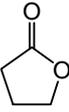
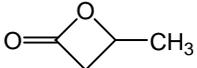
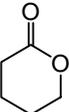
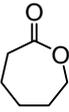
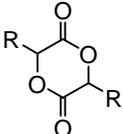
1.2.2.6. Monómeros

Existe una amplia gama de monómeros que han sido utilizados para la obtención de poliésteres que puedan ser utilizados en ingeniería tisular. Dentro de ellos se encuentran el glicólido, el láctido, la ϵ -caprolactona, la pivalolactona, la γ -butirolactona, entre otras.

Las estructuras de varios de estos monómeros se representan en la tabla

1.1.

Tabla 1.1. Estructuras y nomenclatura de varios monómeros.

β -propiolactona		β -PL
γ -butirolactona		γ -BL
β -butirolactona		β -BL
δ -valerolactona		δ -VL
ϵ -caprolactona		ϵ -CL
R=H; glicólido		GA
R=CH ₃ ; láctido		LA

Algunos monómeros como es el caso del glicólido o del láctido son obtenidos a partir del calentamiento de sus respectivos ácidos bajo determinadas condiciones de reacción [64]. Por ejemplo, el láctido es preparado a partir del calentamiento del ácido láctico a una temperatura de 120°C hasta que el agua deje de destilar en el proceso, es entonces cuando se aumenta la temperatura hasta los 140°C y la presión se reduce hasta los 10

1. Introducción

mmHg. Después de calentar por varias horas, la presión es reducida aun más y la temperatura se incrementa hasta que el láctido comience a destilar. (3,6-dimetil-1,4-dioxan-2,5-diona) diláctido contiene dos centros asimétricos, es por ellos que existe como L-láctido, D-láctido, *meso*-láctido y una mezcla racémica de D,L-láctido, de los cuales podemos obtener diferentes polímeros con distintas características.

1.2.2.7. 2-etilhexanoato de estaño [$\text{Sn}(\text{Oct})_2$]

El [$\text{Sn}(\text{Oct})_2$] es uno de los catalizadores más utilizados en la ROP de las lactonas y los láctidos [65-70] y ha sido aprobado por la Administración Americana de Fármacos y Alimentos (FDA) como un aditivo alimenticio. El mecanismo de polimerización ha sido ampliamente discutido y después de varias propuestas [71-73] no ha sido hasta ésta década que se ha descrito [74-77]. El [$\text{Sn}(\text{Oct})_2$] no está considerado como un catalizador ideal desde que se sabe que el peso molecular no depende del ratio molar entre el monómero y el catalizador. El mecanismo más prometedor es el de coordinación-inserción donde el grupo funcional hidroxilo se coordina con el [$\text{Sn}(\text{Oct})_2$] formándose un complejo alcóxido-estaño. El mecanismo por el cual actúa el catalizador es el representado en la figura 1.13.

El [$\text{Sn}(\text{Oct})_2$] es un potente agente transesterificador y los copolímeros obtenidos mediante su uso generalmente presentan una microestructura al azar [78]. Un incremento en la temperatura de reacción o los tiempos de reacción provocan un aumento de las reacciones de transesterificación. En la figura 1.6 se representa la estructura química del [$\text{Sn}(\text{Oct})_2$].

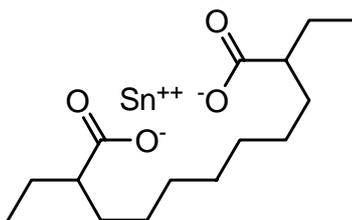


Figura 1.6. Estructura química del $[\text{Sn}(\text{Oct})_2]$

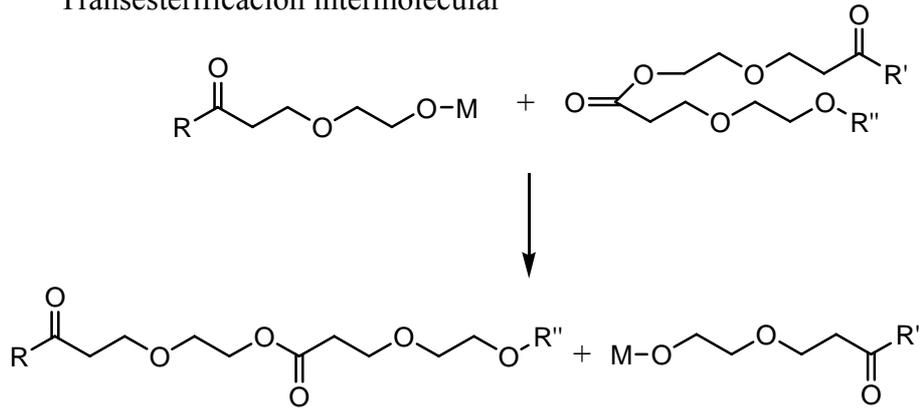
1.2.2.8. Reacciones de transesterificación

Es bien conocido que en las ROP de las lactonas y los láctidos el catalizador o el iniciador provocan reacciones de transesterificación intra e intermoleculares a elevadas temperaturas [79] y tiempos de reacción excesivamente largos [80] (ver figura 1.7).

Las reacciones de transesterificación intermoleculares modifican la secuencia de las copolilactonas y evitan la formación de copolímeros en bloque. Las reacciones de transesterificación intramoleculares como por ejemplo, las *back-biting*, provocan la degradación de las cadenas poliméricas y la formación de oligómeros cíclicos [81]. A partir de ambos tipos de reacciones de transesterificación es posible obtener polímeros con distribuciones anchas de pesos moleculares.

1. Introducción

Transesterificación intermolecular



Transesterificación Intramolecular (back-biting)

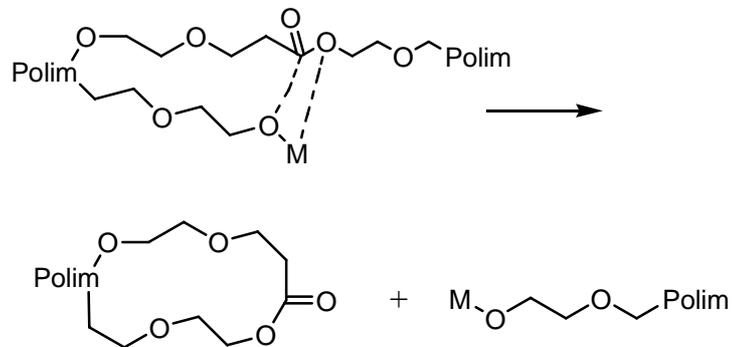


Figura 1.7. Esquemas de las reacciones de transesterificación intra e intermolecular.

Como se observa en la figura anterior cada reacción de transesterificación provoca una ruptura al azar de cadenas de polímero. En este sentido un ataque en la cadena polimérica conduce a residuos poliméricos libres

y a un nuevo y modificado polímero al azar. Consecuentemente, un copolímero original con estructura de bloque puede ser convertido a copolímero al azar después de sufrir una transesterificación [82]. Los principales parámetros que influyen en las reacciones de transesterificación son la temperatura, el tiempo de reacción y la naturaleza y concentración del iniciador o catalizador [83]. Dependiendo del metal usado el iniciador es más o menos activo para provocar reacciones colaterales como son las reacciones de transesterificación [83]. Se ha publicado la reactividad relativa de diferentes alcóxidos metálicos utilizados como iniciadores en los mecanismos de polimerización: $\text{Bu}_2\text{Sn}(\text{OR})_2 > \text{Bu}_3\text{SnOR} > \text{Ti}(\text{OP})_4 > \text{Zn}(\text{OR})_2 > \text{Al}(\text{OR})_3$ [83]. La contribución de los procesos de transesterificación en el caso de D,L-láctido (D-LA) fue considerablemente más alta que la observada en los procesos de polimerización del L,L láctido (L-LA). La diferencia en el número de reacciones colaterales fue atribuida parcialmente a la rigidez de las cadenas poliméricas. El poli(D-LA) es más flexible que el poli(L-LA) debido a los bloques de láctido atáctico.

Cuando la ϵ -caprolactona y el L-láctido son copolimerizados en bloque la secuencia de adición del monómero es muy importante. Copolímeros en bloque AB pueden ser preparados mediante ROP con el $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ como catalizador y etanol como iniciador provocando la polimerización inicial de la ϵ -caprolactona [84]. Para obtener copolímeros totalmente al azar los bloques de L-láctido deben reaccionar primero y el macrómero formado con los grupos hidroxilos terminales deben ser usados para iniciar la polimerización de la ϵ -caprolactona.

1. Introducción

1.2.3. Polimerización por radicales libres

La polimerización por radicales libres es el método más usado cuando utilizamos monómeros de naturaleza vinílica y diénicos, y su mecanismo [85] es el más conocido de todos los de adición.

1.2.3.1. Iniciación

La iniciación requiere la formación de radicales libres reactivos que puedan adicionarse al monómero en la etapa de propagación. Los radicales libres pueden generarse por la descomposición de un iniciador, pero además pueden generarse directamente en la propia molécula del monómero sin la presencia de iniciador añadido. En éste segundo caso, los agentes formadores de radicales libres pueden ser la radiación electromagnética, o la simple colisión térmica. La existencia de una iniciación térmica pura es difícil de establecer, porque las impurezas pueden participar actuando como iniciador incontrolado. La iniciación fotoquímica puede darse cuando el monómero tiene una banda de absorción suficientemente fuerte. En general, la energía de longitud de onda superior a 200 nm no es suficiente para ionizar el doble enlace, por lo que las fotopolimerizaciones transcurren predominantemente por vía radical. La radiación de alta energía produce especies activas que pueden ser radicales, catiónicas o aniónicas, por lo que la polimerización iniciada por radiación de alta energía puede transcurrir por cualquiera de estos mecanismos. Sin embargo, las formas iónicas generadas son suficientemente estables para iniciar la polimerización sólo a bajas temperaturas, por lo que la polimerización a temperatura ambiente o superior transcurre por vía radical.

De todos los métodos para iniciar la polimerización por radicales libres, el más común es mediante el uso de iniciadores. Estos son sustancias que se descomponen muy fácilmente para dar fragmentos moleculares que tienen el carácter de radicales libres. La descomposición de un iniciador puede provocarse mediante calor, radiación o luz y reacciones redox. La más común es la descomposición térmica y los iniciadores más comunes dentro de esta categoría son los peróxidos, hidroperóxidos, azocompuestos y en general sustancias con enlaces lábiles, cuya energía de enlace es del orden de 25-40 kcal/mol, y que se rompen homolíticamente.

Por ejemplo la descomposición del peróxido de benzoílo o el azo-bis-isobutironitrilo se representa en la figura 1.8.

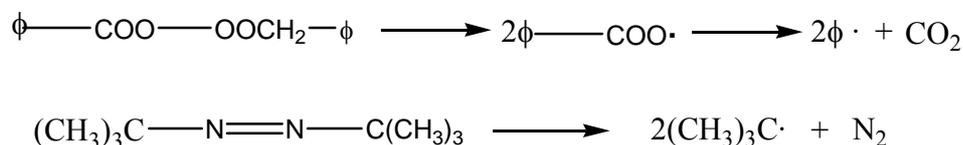


Figura 1.8. Descomposición térmica del peróxido de benzoílo y el azo-bis-isobutironitrilo.

La elección del iniciador depende de la temperatura a la cual se desee realizar la polimerización, pues cada compuesto se descompone con una velocidad útil en intervalos de temperatura diferentes. Los iniciadores antes mencionados son solubles en solventes orgánicos. Para polimerizar en solución acuosa son muy utilizados los peróxidos inorgánicos como el persulfato de potasio o el agua oxigenada.

1. Introducción

Una vez generados los radicales libres ($R\cdot$) procedentes de la descomposición del iniciador (por cualquiera de los métodos que acabamos de describir), la iniciación de la polimerización consiste en el ataque de $R\cdot$ al monómero. Si se trata de un vinilo la representación de la figura 1.9 sería el mecanismo adecuado.

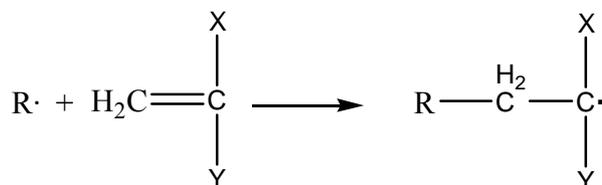


Figura 1.9. Mecanismo de iniciación provocado por radicales libres.

Lo más importante de la etapa de iniciación es que la actividad radical pasa a estar localizada en el carbono de la unidad monomérica. Este centro activo monomérico es el que ataca de nuevo al monómero en las sucesivas etapas de propagación.

1.2.3.2. Propagación

El primer paso de la propagación es la reacción entre un centro activo y una nueva molécula de monómero, donde dicho centro activo radical sigue estando localizado en una unidad monomérica. En general, al cabo de $x-1$ adiciones, el mecanismo de propagación será el representado en la figura 1.10.

Como consecuencia de las adiciones sucesivas, la cadena polimérica va creciendo, por el extremo en el cual se encuentra situado el centro activo propagador, hasta que dicho centro se desactiva en la etapa final de terminación.

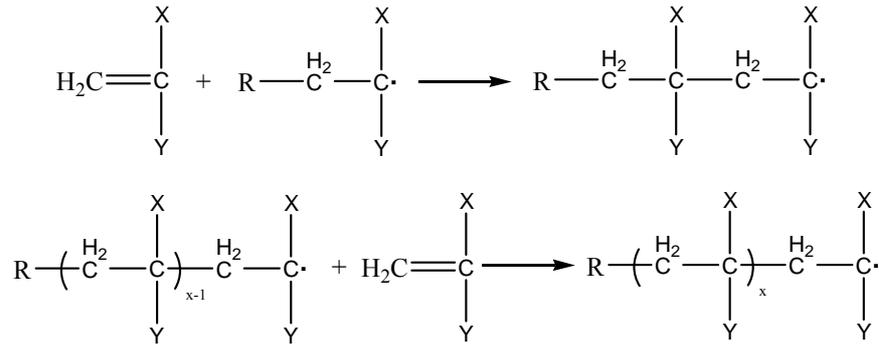


Figura 1.10. Mecanismo del proceso de propagación en la polimerización radical.

1.2.3.3. Terminación

Son dos los mecanismos a través de los cuales se pierde la actividad del centro propagador, la dismutación o desproporción y la combinación o apareamiento. Ambos son procesos bimoleculares en los cuales dos centros activos se desactivan mutuamente por colisión. En la figura 1.11 se representa esquemáticamente el mecanismo.

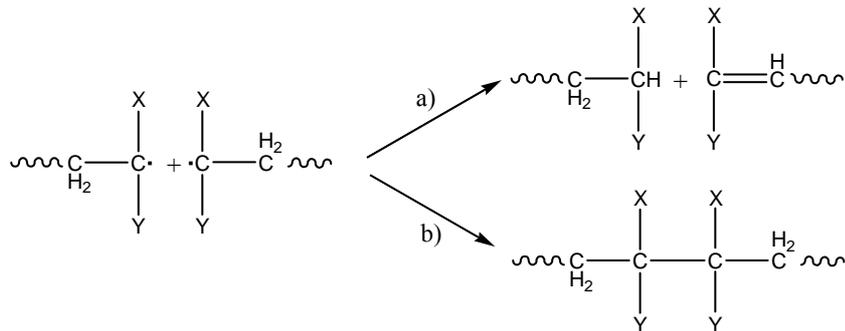


Figura 1.11. Mecanismo de los procesos de terminación en la polimerización radical. a) dismutación o desproporción y b) combinación o apareamiento.

1. Introducción

En la combinación, b), se unen dos cadenas moleculares para dar una sola de mayor longitud. Es un proceso que ocurre sin energía de activación, ya que se trata del apareamiento de dos electrones. En la dismutación, a), tiene lugar la transferencia de un hidrógeno y es por ello un proceso con energía de activación, cuya velocidad depende de la temperatura. La contribución de éste mecanismo se hace más importante al aumentar la temperatura. La importancia relativa de cada uno de estos dos mecanismos de terminación varía de unos monómeros a otros.

En cada etapa de terminación dos cadenas poliméricas, portadoras de centros activos en sus extremos, pierden dichos centros y se convierten en macromoléculas inactivas, cuyo grado de polimerización queda ya determinado. A medida que se suceden estas etapas de terminación, en el medio reaccionante se va acumulando las moléculas de polímero inactivo ya formado.

1.3. Poliésteres

Los poliésteres son los polímeros biodegradables más estudiados. El mecanismo de degradación de éstos materiales puede ser clasificado como un proceso de degradación en masa con rupturas hidrolíticas al azar de las cadenas poliméricas. Los poliésteres han sido utilizados en muchas aplicaciones de las cuales hablaremos más adelante. Por otro lado y debido a sus características, los poliésteres también están siendo utilizados como materiales alternativos en ingeniería tisular. Como ya hemos comentado, la vía más común de obtener éstos materiales con altos pesos moleculares es a través de ROP de monómeros cíclicos como por ejemplo, el L,D-láctido, el L-láctido, el D-Láctido, la ϵ -caprolactona, entre otros.

Los poliésteres y poliahidridos son mayoría dentro de los polímeros entrecruzados reabsorbibles. Las propiedades de estas redes están gobernadas por las propiedades de los monómeros utilizados y además por la densidad de entrecruzamiento, la cual está relacionada con la distancia entre puntos de entrecruzamiento. Un aumento de la densidad de entrecruzamiento implica que el peso molecular de la cadena entre puntos de entrecruzamiento disminuye, aumentando la temperatura de transición vítrea, T_g , del material y el módulo de Young (E') en la región de comportamiento elastomérico, por encima de T_g . También el entrecruzamiento de los poliésteres ha sido diseñado para obtener materiales reabsorbibles con alta resistencia o con propiedades elásticas.

1.3.1. Modificaciones de los poliésteres

Una de las modificaciones químicas más utilizadas en los poliésteres ha sido la incorporación de dobles enlaces a su estructura provenientes de acrilatos como pueden ser el ácido itacónico, metacrílico, acrílico entre otros, permitiendo con ello la preparación de precursores que den lugar a poliésteres entrecruzados mediante polimerización por vía radical [86-92]. Los poli(α -hidroxi ácidos) provenientes de acrilatos y metacrilatos han sido preparados mediante la funcionalización de oligómeros terminados en grupos hidroxilos haciéndolos reaccionar con diferentes cloruros de ácidos [93-98] o por transesterificación de PDLA de alto peso molecular con diacrilatos [99].

En el caso de precursores de redes de PLLA y de PCL se han descrito en la literatura la incorporación de dobles enlaces a estos poliésteres localizados en cadenas laterales de su estructura química. Uno de los casos descritos en la literatura es el de poli (L-láctido-co-ácido glicólido-co-L-cerina) el cual contenía en su estructura química grupos hidroxilos laterales los cuales fueron

1. Introducción

acrilados y posteriormente polimerizados obteniendo sus respectivas redes [100]. Otro caso descrito en la literatura es el injerto a la cadena lateral del poli (ácido L-aspartico) mediante los grupos aminos libres del poli (ácido L-láctico-co-glicina).

Modificando la estructura química de los poliésteres mediante la incorporación de precursores de naturaleza acrílica podemos obtener redes con propiedades elásticas e hidrofiliidad variable en dependencia del grado de metacrilación [101], así como aumentar las propiedades mecánicas de dichos materiales y que de esta manera que puedan ser utilizados en otras aplicaciones.

1.3.2. Degradación de los poliésteres

Los polímeros biodegradables reciben una especial atención en nuestros días debido a sus aplicaciones farmacéuticas y quirúrgicas [102]. Varios investigadores han obtenido novedosas estructuras por vía química que les confieren una gran importancia en estas aplicaciones debido a sus características térmicas y mecánicas y su descomposición en productos no-tóxicos.

Existen dos mecanismos por los cuales las cadenas poliméricas pueden ser hidrolizadas: 1) pasivamente mediante la hidrólisis química o 2) activamente por la acción de las enzimas. Existe muchos factores que influyen en los tiempos de degradación entre los cuales se encuentran, el tipo de enlace de la cadena polimérica, la hidrofiliidad, el peso molecular, la cristalinidad, la composición del copolímero y por último la presencia de productos de bajo peso molecular [103,104]. Varios polímeros biodegradables contienen diferentes tipos de enlaces hidrolizables. Los polímeros que contienen enlaces

de anhídridos [105] u ortoésteres [106], son los más reactivos y por consiguiente los que se degradan en tiempos más cortos. Los enlaces de ésteres son degradados más lentamente y los carbonatos [107] son totalmente resistentes a la hidrólisis.

1.3.3. Poliláctico. Estereoisómeros, características y degradación

Debido a la presencia de dos centros quirales, existen tres tipos de monómero de láctido (ver figura 1.12).

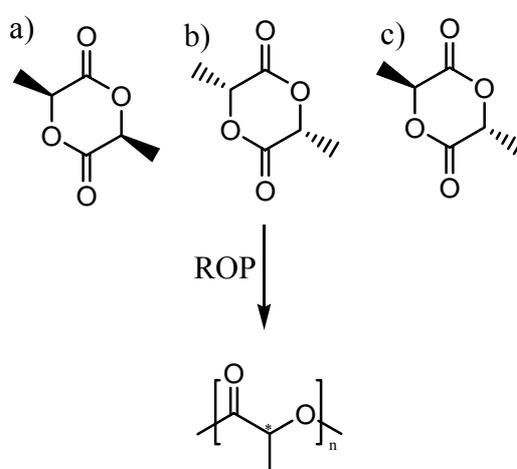


Figura 1.12. Estructuras de las diferentes estereo-formas del monómero de L-láctido y el producto de sus unidades repetitivas, marcado con * en el centro quiral. a) L-Láctico, b) D,D-láctido, c) meso-láctido.

La repetición de las unidades con diferentes configuraciones han sido utilizadas para producir diferentes estereo-copolímeros donde sus propiedades

físicas y mecánicas y los tiempos de degradación son fácilmente ajustables. La manera más eficiente de preparar poliláctidos es empleando la ROP mediante iniciadores de coordinación [108]. Este método usualmente nos permite obtener polímeros con distribuciones estrechas de pesos moleculares. La polimerización de los diferentes estereo-isómeros nos da como resultado materiales con diferentes propiedades. Los polímeros derivados de los monómeros de L-láctido y el D-láctido puro son semicristalinos, relativamente duros con temperaturas de fusión alrededor de 184°C [109] y con una temperatura de transición vítrea alrededor de 55°C [110]. En la polimerización del *rac* (D,L)-láctido y *meso*-láctido se obtienen materiales amorfos con una temperatura de transición vítrea similar a los estereo-isómeros cristalinos [109]. Los poliláctidos degradan térmicamente, especialmente a temperaturas mayores de 190°C. El calentamiento de estos materiales por encima de estas temperaturas provoca la disminución del peso molecular [109]. El poli(L-láctido) es biocompatible y cuando es implantado en el organismo vivo se empieza a producir su degradación hidrolítica a ácido láctico el cual es un intermediario natural en el metabolismo de los carbohidratos [111]. La alta capacidad degradativa de estos materiales es probablemente debida a la escisión hidrolítica de los dominios amorfos. La reacción de copolimerización del L-láctido con otros monómeros como por ejemplo el glicólido o la ϵ -caprolactona han sido ampliamente investigados. Los procesos de copolimerización son una importante herramienta para modificar las propiedades de los copolímeros resultantes y ajustarlos a las necesidades de las aplicaciones.

Las propiedades de cristalinidad, fragilidad y la temperatura de fusión del poli(L-láctido) pueden ser afectadas por la incorporación de unidades comonoméricas tales como 1,5-dioxapan-2-ona (DXO). Las grandes diferencias

en el ratio de reactividad entre la DXO y los láctidos nos permiten obtener microestructuras de polímeros en bloque con respecto a la copolimerización al azar [69].

1.3.4. Poli (ϵ -caprolactona). Características y degradación

La poli(ϵ -caprolactona) (PCL) es un poliéster alifático lineal y semicristalino, tiene su temperatura de fusión (T_m) alrededor de 60°C y su temperatura de transición vítrea (T_g) alrededor de -60°C [112] y se obtiene a partir de la ϵ -caprolactona. La repetición molecular de la estructura de homopolímeros de PCL consiste en 5 grupos metilenos apolares y un éster con propiedades polares. Esta estructura le brinda a la PCL propiedades únicas, con propiedades mecánicas similares a las poliolefinas debido a su semejanza estructural.

Los polímeros de alto peso molecular y copolímeros de ϵ -caprolactona son preparados por apertura de anillo, utilizando un amplio rango de temperaturas. Las temperaturas de polimerización son típicas en el rango de 140 - 150°C . El proceso de polimerización es normalmente catalizado por estanoatos. Otros catalizadores utilizados en estas reacciones son los ácidos de Lewis y ácidos orgánicos. En estas reacciones los pesos moleculares son controlados por la adición de agentes controladores de cadenas. Los agentes más frecuentes son el agua, alcoholes primarios, aminas u otros compuestos con hidrógenos activos. La figura 1.13 representa el mecanismo de la polimerización de la ϵ -caprolactona [113].

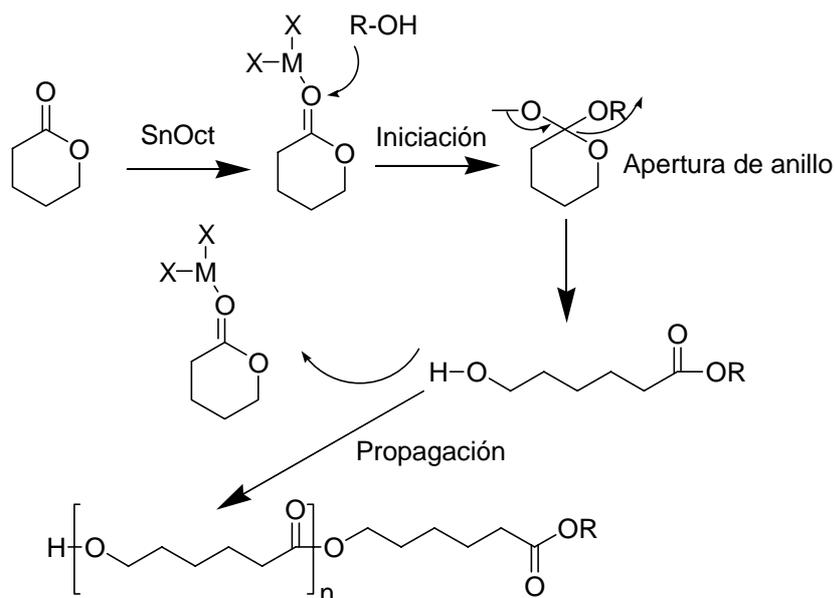


Figura 1.13. Representación del mecanismo de polimerización de PCL

La poli ϵ -caprolactona ha sido minuciosamente investigada por la posibilidad de obtener mezclas de este poliéster alifáticos con un gran número de productos comerciales tales como el policloruro de vinilo y policarbonatos. Estos materiales tienen una gran importancia en las aplicaciones biomédicas debido a que en su proceso de degradación se obtienen productos no-tóxicos. No obstante este material presenta grandes tiempos de degradación lo cual a veces es una desventaja en aplicaciones biomédicas. La degradación “*in vivo*” del poli D-láctido es 2,8 veces más rápida que la degradación de cadenas de poli ϵ -caprolactona en las mismas condiciones [114]. Se han utilizado diferentes alternativas para incrementar la velocidad de degradación y una de ellas ha sido la copolimerización de la ϵ -caprolactona con otros monómeros. Se ha

estudiado la degradación de la ϵ -caprolactona y el D-láctido con varias composiciones llegando a la conclusión que dichos copolímeros degradan más rápido que sus polímeros puros [115]. Esta observación ha sido atribuida a las diferencias morfológicas y especialmente a la disminución de la cristalinidad.

Mientras que la PCL y sus copolímeros son biodegradables como consecuencia de la susceptibilidad de los enlaces ésteres a la hidrólisis, la biodegradación de la PCL es más lenta que los poli(α -hidroxiácidos) como el poliláctico, debido a la combinación de su cristalinidad y el alto carácter olefínico.

1.3.5. Aplicaciones de los poliésteres

Los poliésteres alifáticos han sido ampliamente utilizados en muchas aplicaciones como por ejemplo en la agricultura, industria textil y más recientemente en la industria biomédica. La poli(ϵ -caprolactona) ha sido ampliamente utilizada en la fabricación de contenedores [116] para la plantación de árboles y semillas y por otro lado utilizada en la fabricación de dispositivos implantables de liberación controlada de fármacos [117]. También sus mezclas con otros polímeros han sido utilizadas en la fabricación de bolsas de compras [118]. Además, la poli(ϵ -caprolactona) ha sido utilizada como un material bifuncional, o sea como implante y además con capacidad de liberar fármacos (Capronol) [117]. Mezclas con otros polímeros como es el caso de poli(D,L-láctido) (PDLA), han sido utilizados en la liberación de fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, entre otros [119-123].

Polímeros alifáticos a base de ácido láctico han sido ampliamente utilizados en una gran variedad de aplicaciones biomédicas, tales como en

1. Introducción

suturas quirúrgicas biodegradables, implantes dentales y de próstata, clavos y otros dispositivos que ayuden a la fijación interna de fracturas de huesos, liberación controlada de varios tipos de fármacos incluidos los anticonceptivos, etc.

De forma general, las áreas donde se utilizan con mayor frecuencia los poliésteres son en el campo médico y en la industria del plástico [124], debido a su biodegradabilidad controlada, a sus propiedades mecánicas adecuadas, su permeabilidad al aire, entre otras características, que hacen de estos materiales más que adecuados para ser introducidos en otros campos como la ingeniería tisular, cual tópico describiremos a continuación.

1.4. Ingeniería tisular

Como han definido Langer y Vacanti [125,126], la ingeniería de tejidos es un campo de investigación interdisciplinar que aplica los principios de la ingeniería y otras ciencias hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que tengan la capacidad de restaurar, mantener y mejorar la función tisular. Partiendo de la base del desarrollo que existe en la actualidad de materiales que se están utilizando en este campo, es imprescindible entender los procesos de formación y regeneración celular con el objetivo de inducir a la formación de nuevo tejido funcional y estudiar la interrelación existente entre dicho tejido y los materiales a utilizar [127].

En el caso específico de la ingeniería de tejidos de hueso, existen varios enfoques, pero todos coinciden en que son imprescindibles tres componentes esenciales: un cultivo de células específicas, moléculas bioactivas y por último y no menos importante, un material tridimensional (*scaffold*). Un ejemplo clásico sería utilizando un material poroso, realizar una siembra de células

osteoblásticas en presencia de factores de crecimiento, proteínas, etc., y posteriormente implantar el conjugado “material-células” en el defecto óseo, con el objetivo de inducir el crecimiento del tejido nuevo. La meta que se pretende alcanzar no es más que el desarrollo de materiales tridimensionales, provenientes de distintas fuentes, en donde las células sean capaces de adherirse, proliferar, diferenciarse (por ejemplo al utilizar células mesenquimales y su posterior diferenciación a osteoblastos) y organizarse en un tejido óseo funcional una vez el material se haya degradado.

Un cultivo convencional de células involucra un crecimiento celular en condiciones artificiales, las cuales (las células) puedan crecer, replicarse y ser utilizadas en muchas aplicaciones. No obstante, las células presentes en estos cultivos por si solas no se organizan en tejidos que puedan ser implantados posteriormente en el organismo humano, sino que necesitan de estímulos externos para dicha organización. En el organismo, las células son bombardeadas con estímulos eléctricos, químicos, etc., los cuales les indican a las células qué deben hacer en cada caso. Si estas señales no son recibidas correctamente debido a enfermedades o traumas, entonces las células se de-diferencian, se desorganizan y eventualmente mueren.

Los estímulos estructurales involucran la interacción de las células con su matriz extracelular (ECM). Un ejemplo es que el hueso está formado por ECM donde en su composición podemos encontrar un composite de redes fibrosas de colágeno encerradas dentro de una matriz de fosfato de calcio. Las células óseas (osteoblastos, osteoclastos y osteocitos) existen en una relación simbiótica con la matriz extracelular, primero creándola, posteriormente remodelándola y sucesivamente siendo controladas por ella (ECM). La comunicación física entre las células y la matriz extracelular directa e

1. Introducción

indirectamente influye en la forma y la función celular y dichas señales son estímulos necesarios para la actividad celular [125,126].

Las funciones celulares y sus respuestas a estímulos medioambientales, tales como: mecánicos, eléctricos, estructurales y químicos son mediadas por moléculas de base proteica, llamadas comúnmente como factores de crecimiento. Los factores de crecimiento son proteínas solubles que viajan a distancias relativamente cortas desde una células a otras y desencadenan respuestas celulares. Las respuestas a otros tipos de estímulos están mediadas por otro tipo de estructuras: citoesqueleto, adhesiones focales, proteínas transmembrana. Pero, ¿por qué es necesaria esta técnica para regenerar tejido óseo?

Existen aproximadamente un millón de casos de defectos óseos anualmente que requieren de injertos de tejido óseo que conlleve a su integración [128]. Los tratamientos que se ponen en práctica son los injertos de tejido óseo autólogo, reparación autógena del hueso y alternativas de injerto con cerámicas y metales [128-132]. Los injertos de tejido óseo autólogo, que no es más que extracción de hueso del mismo paciente, de otra parte de su cuerpo, han sido desde hace varios años el tratamiento más utilizado por el hecho de que provee células osteogénicas así como factores osteoinductivos esenciales que se necesitan para la cura del tejido y su regeneración [131,133]. Las muestras de tejido suelen ser tomadas del hueso trabecular de la cresta ilíaca y en algunos casos del hueso cortical [131,134]. No obstante, y aunque se ha empleado en muchos pacientes con un alto grado de eficacia, los casos en los que pueden ser utilizados es muy restrictivo debido a la cantidad de tejido autógrafo a extraer. Una alternativa son los aloinjertos (tejido extraídos de otro cuerpo humano), pero el grado de incorporación del tejido es menor que el autoinjerto. Además este tipo de injerto puede provocar el rechazo inmune del

paciente, la transmisión de patógenos del cuerpo donador y con menos frecuencias infecciones ya en el cuerpo huésped después del transplante [128-132,135].

Otra alternativa a las expuestas anteriormente son los injertos de metales y cerámicas [128], no obstante estas presentan muchas desventajas. Los metales aunque proveen un soporte mecánico inmediato al sitio del defecto, presentan una integración pobre con el tejido. Por otro lado, las cerámicas presentan una baja resistencia a la tensión, son frágiles y no pueden ser usados en sitios que soporten gran torsión.

Como hemos descrito hasta el momento, las alternativas que existen para el reemplazo y restauración de tejido óseo no son eficaces de ahí la gran importancia de seguir investigando sobre una alternativa real que cumpla con una serie de requisitos, los cuales describimos a continuación, haciendo énfasis en las propiedades mecánicas del material y que nos pueda ser útil en ingeniería tisular.

1.4.1. Scaffolds

Los recientes avances en el campo de la ingeniería tisular son en gran medida debidos al desarrollo de materiales poliméricos tridimensionales que puedan ser implantados en un sitio determinado en el organismo humano. Cualquier tejido consiste en una matriz y uno o varios tipos de células. La matriz “in vivo” consiste en un scaffold (material de estructura porosa) tridimensional donde las células puedan encontrar un ambiente y arquitectura adecuada para su desarrollo [127]. Además, sería mejor si este scaffold pudiera servir de reservorio de agua, nutrientes y factores de crecimiento. En éste sentido, muchos autores destacan que a la hora de restaurar y regenerar el tejido sea necesaria la presencia del scaffold, como una matriz temporal que

1. Introducción

ayude a la proliferación, a la deposición de la matriz extracelular, con el consecuente crecimiento celular hasta la restauración total del tejido óseo [127,128,136]. Por otro lado, el material debe ser capaz de actuar como molde en el proceso de vascularización del neo-tejido y participar activamente en los procesos de regeneración a través de la liberación de factores de crecimiento y de diferenciación presentes en la estructura.

Por todo lo antes descrito, es lógico pensar que un scaffold tridimensional es un componente esencial a la hora de seleccionar la ingeniería de tejidos como una alternativa. No obstante hay que tener en cuenta una serie de propiedades que deben cumplir estos materiales para que puedan ser usados en tales aplicaciones.

Las siguientes propiedades han sido descritas en la literatura como esenciales:

- Biocompatibilidad: el scaffold debe integrarse en el tejido receptor sin producir ninguna respuesta inmune [136-139].
- Porosidad: el material debe poseer una gran estructura porosa, con dichos poros interconectados y de tamaño adecuados para permitir la adhesión y proliferación celular, permitiendo la neo-vascularización del tejido circundante. Además, los scaffold pueden tener una microporosidad que permita la capilaridad. La porosidad y la interconectividad son factores importantes a tener en cuenta en el momento de diseñar un scaffold y sobre todo al ponerse en contacto con tejido óseo debido a las características metabólicas del hueso, donde se esperan que ocurran grandes traslados de masa, incluso en condiciones "in vitro" [140]. No obstante, el grado de porosidad influye en otras propiedades tales como la estabilidad mecánica, por lo que dependiendo del sitio de aplicación se debe establecer un balance entre ellas.

- **Tamaño de poro:** esta propiedad es una de las más importantes, por el simple hecho de que si el poro es muy pequeño, habrá una oclusión del poro por las células. Esto puede prevenir la penetración celular, producción de matriz extracelular y la neo-vascularización de las áreas internas del scaffold. En el caso de la ingeniería tisular de hueso este aspecto es esencial y muchos autores describen como tamaño ideal en el rango entre 200 y 900 μm [139-141]. No obstante Holly y colaboradores [142] han reportado un concepto diferente en el cual creen que la reconstrucción del hueso solo es efectiva utilizando un material temporal tridimensional con una estructura de poros grandes interconectados en un rango entre 1.2 y 2.0 mm. No obstante este tamaño de poro afecta directamente sus propiedades mecánicas.
- **Propiedades superficiales:** propiedades como la estructura química de la superficie del material o la topografía, afectan a la adhesión y proliferación celular [143-145]. Las propiedades químicas están relacionadas con la capacidad de las células de adherirse al material, así como las topográficas cuando el objetivo que se quiere es la osteoconducción. Como ha definido Davies y colaboradores [146], la osteoconducción es el proceso en el cual las células osteogénicas migran hacia la superficie del scaffold o hacia el interior de los poros que permite el crecimiento del tejido óseo.
- **Osteoinducción:** es el proceso por el cual las células madres y osteoprogenitoras son utilizadas en el proceso de cura del hueso y estimuladas para experimentar la diferenciación osteogénica [147]. No obstante, cuando la parte del hueso a regenerar es grande, la osteoinducción natural combinada con un scaffold biodegradable puede

no ser suficiente, es por ello que lo ideal sería que el scaffold por si solo tuviera propiedades osteoinductoras.

- Propiedades mecánicas y biodegradación: en condiciones “in vitro”, el scaffold debe tener una fuerza mecánica suficiente para resistir las presiones hidrostáticas y mantener su forma porosa que permita el crecimiento celular y la producción de matriz extracelular [138]. En condiciones “in vivo” y porque el hueso esta sometido a una tensión continuada, las propiedades mecánicas del material implantado deben estar perfectamente combinadas con el tejido óseo. Por otro lado, los tiempos de degradación del scaffold deben estar en el rango de los tiempos de crecimiento celular, dando por hecho que una vez que la lesión esté totalmente curada el material haya sido totalmente degradado [125].

1.4.2. Biomateriales utilizado en ingeniería de tejidos óseo

La selección del material apropiado para la fabricación del scaffold que vaya a ser utilizado en ingeniería tisular de hueso es un aspecto muy importante. Para estos fines se han propuesto numerosos materiales, tales como cerámicas y materiales poliméricos tanto de origen natural como sintéticos. Las cerámicas han sido muy utilizadas en el campo de la regeneración y restauración ósea [148]. Estos materiales provienen tanto de fuentes naturales (hidroxiapatita coralina) o sintéticos como la hidroxiapatita sintética o el β -fosfato tricálcico (β -TCP) [148]. Estos materiales han sido considerados como materiales osteoinductivos y osteoconductivos y de ahí su utilidad en ingeniería tisular para la regeneración ósea. A pesar de estas

características, presentan muchas limitaciones debido a su baja estabilidad mecánica.

Una alternativa a los materiales descritos anteriormente son los polímeros biodegradables, los cuales se creen que son los materiales idóneos para ingeniería tisular de hueso [136,139]. Estos pueden ser divididos en dos grupos, de fuentes naturales y los materiales sintéticos. Los polímeros biodegradables naturales son aquellos que son obtenidos de fuentes naturales, incluso tanto de origen animal como vegetal. En este grupo podemos encontrar el colágeno [149-152], el fibrinógeno [153-160], el quitosano [161-168], almidón [157,169-182], ácido hialurónico (HA) [183-185] y poli(hidroxibutirato) [186,187]. Las principales ventajas de éstos materiales son su bajo potencial inmunogénico, su comportamiento bioactivo y su capacidad de interactuar con el tejido huésped, su versatilidad química y en algunos casos sus casi inagotables fuentes naturales.

Por otro lado se encuentran los polímeros biodegradables sintéticos que son prácticamente los más usados en ésta aplicación en concreto (ingeniería tisular de hueso). La versatilidad química de estos materiales y su fácil procesado los hacen más competitivos que los naturales. Los más usados son los poli(α -hidroxiácidos) [188-211], la poli(ϵ -caprolactona) [212-217], el poli(fumarato de propileno) [209,218-226], policarbonatos [227-231] y los polianhidridos [209,232,233].

En la tabla 1.2, se describen las principales características y origen de la mayoría de los materiales utilizados.

1. Introducción

Tabla 1.2. Polímeros naturales y sintéticos más usados en ingeniería tisular de hueso.

Material	Origen	Características	Ref.
Colágeno	Natural	Baja respuesta inmune, buen sustrato para la adhesión celular y bajas propiedades mecánicas	149-152
Fibrina	Natural	Promueve la migración celular, la vascularización y la osteoconducción	153-160
Quitosano	Natural	Hemostático, promueve la osteoconducción y curación de heridas	161-168
Almidón	Natural	Comportamiento termoplástico, buen sustrato para la adhesión celular, biocompatible y no-tóxico.	157,171-182
Ácido hialurónico (HA)	Natural	Scaffold con bajas propiedades mecánicas, inmunogenicidad mínima	183-185

Poli(hidroxiбутирато)	Natural	Substrato adecuado para el crecimiento óseo, su utilidad es limitada debido a su fragilidad.	186,187
poli(α -hidroxiácidos)	Sintético	Degradación por hidrólisis y sus productos de degradación entran en el ciclo de Krebs (ácido láctico o glicólico) y son excretados por la orina como es el caso del ácido glicólico	188-210
poli(ϵ -caprolactona)	Sintético	Degradación lenta por hidrólisis o por erosión, baja versatilidad química, los productos de degradación también son eliminados por el ciclo de Krebs.	211-217
poli(fumarato de propileno)	Sintético	Poliéster insaturado, resultados biológicos satisfactorios, es una alternativa al polietilenglicol y al ácido fumárico.	209,218-226

1. Introducción

poli carbonatos	Sintético	Buena biocompatibilidad en implantes óseos	227-231
polianhidridos	Sintético	Biocompatibles, usados en sistemas de liberación de fármacos y como soportes en regeneración de hueso cortical	232,233

1.4.3. Aspectos fundamentales del tejido óseo

El tejido óseo es un tipo especializado de tejido conectivo constituyente principal de los huesos en los vertebrados. El tejido óseo está compuesto por células, fibras y componentes extracelulares calcificados que forman la matriz ósea. Se caracteriza por su rigidez y su gran resistencia tanto a la tracción como a la compresión.

El tejido óseo presenta varias funciones las cuales se detallan a continuación:

1. Como soporte, donde los huesos proveen un soporte rígido a los músculos y tejidos blandos.
2. Protegen a los órganos internos de posibles traumatismos formando varias cavidades como por ejemplo el cráneo, la caja torácica, etc.
3. El de la locomoción
4. Función metabólica, donde el tejido óseo almacena una serie de minerales, especialmente calcio y fósforo [234], necesarios para la contracción muscular y otras muchas funciones. Cuando son

necesarios, el hueso libera dichos minerales en la sangre que los distribuye a otras partes del organismo.

El esqueleto humano esta formado por dos tipos de tejido, el cortical o compacto (80% del volumen total del hueso) y por el hueso trabecular o esponjoso (20% del volumen total del hueso). Dicha proporción varía en dependencia del sitio del esqueleto en que se encuentre.

El hueso cortical es casi compacto, presentando solo un 10% de porosidad y se puede dividir en varios subgrupos como por ejemplo los huesos largos (fémur y tibia), los huesos cortos (muñecas y tobillo) y los huesos planos (cráneo, etc.). Por otro lado, el hueso trabecular presenta una porosidad elevada, entre un 50 y 90% con una estructura de panal de abejas, haciendo que presente una resistencia a la compresión 20 veces inferior al hueso cortical

El hueso cortical se encuentra en las diáfisis de huesos largos, es homogéneo y muy resistente. Forma un conducto tubular que encierra la cavidad medular, donde asientan las principales estructuras neurovasculares junto con la médula ósea amarilla. La superficie externa está cubierta por el periostio formado por una capa exterior del tejido fibroso rica en vasos, nervios y terminaciones sensitivas; en ella se insertan ligamentos y tendones. La capa interior del periostio es una delgada lámina osteogénica formada por osteoblastos. La superficie interna, por su parte, está tapizada con una capa osteogénica similar a la perióstica, pero sin tejido fibroso; es el endostio que se adapta a una superficie irregular puesto que se forman algunas trabéculas. El endostio tapiza la cavidad medular, las cavidades del hueso trabecular y los canales haversianos (ver figura 1.14).

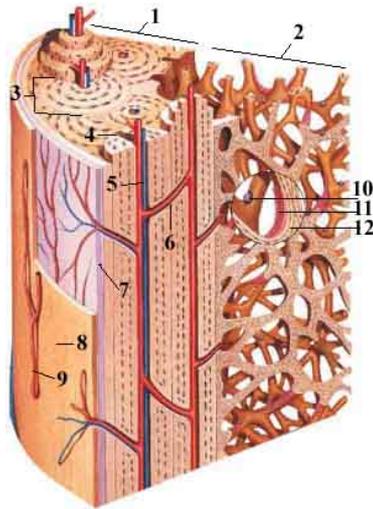


Figura 1.14. Esquema de una estructura ósea: 1: Hueso cortical, 2: Hueso trabecular, 3: Sistema de Havers, 4: Vaso sanguíneo, 5: Canal de Havers, 6: Canal de Volkmann, 7: Periostio, 8: Revestimiento óseo, 9: Vasos del periostio, 10: Osteoclastos, 11: Osteoblastos, 12: Osteocitos [235].

A diferencia del hueso compacto, el hueso esponjoso no contiene osteones, sino que las láminas intersticiales están dispuestas de forma irregular formando unos tabiques o placas llamadas trabéculas. Estos tabiques forman una estructura esponjosa dejando huecos que están llenos de la médula ósea roja. Dentro de las trabéculas están los osteocitos que yacen en sus lacunae (varios espacios rectangulares) y que a su vez están conectados con pequeños canales llamados canaliculos. En este caso, los vasos sanguíneos penetran directamente en el hueso esponjoso y permiten el intercambio de nutrientes con los osteocitos.

1.4.3.1. Constituyentes del tejido óseo

- **La matriz ósea**

La matriz del tejido óseo se encuentra formada por dos fases, una fase mineral y otra fase orgánica (65% material cristalino inorgánico y un 35% matriz orgánica). La fase orgánica esta formada por fibras de colágeno tipo I y por proteínas de menor tamaño como son la osteocalcina, la osteonectina, fosfoproteínas, sialoproteínas, etc., y por glicosaminoglicanos y lípidos. Por otra parte, la fase mineral está formada por cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) entre las fibras de colágeno [234]. La matriz ósea es la que le brinda al hueso sus propiedades mecánicas en tanto las fibras de colágeno le proporcionan flexibilidad y resistencia a la tensión

- ✓ La matriz orgánica

Colágeno: El colágeno tipo I se encuentra abundantemente en la dermis, el hueso, el tendón y la córnea. Se presenta en fibrillas estriadas de 20 a 100 nm de diámetro, agrupándose para formar fibras colágenas mayores. Sus subunidades mayores están constituidas por cadenas alfa de dos tipos, que difieren ligeramente en su composición de aminoácidos y en su secuencia. A uno de los cuales se designa como cadena α_1 y al otro, cadena α_2 [235,236]. Es sintetizado por fibroblastos, condroblastos y osteoblastos [237,238]. Su función principal es la de resistencia al estiramiento.

Osteocalcina: La osteocalcina, también llamada "proteína del hueso con contenido de ácido gamma carboxi glutámico" (BGP) es sintetizada en los osteoblastos y juega un papel importante en la mineralización [239,240] al

1. Introducción

unirse con la hidroxiapatita y favorecer la formación ósea, además de ser una proteína no colegenosa del hueso, que representa un 2 % del total de la proteína ósea. Su síntesis está regulada por la 1,25-dihidroxi-vitamina D.

✓ La matriz inorgánica

La matriz ósea está formada por hidroxiapatita o fosfatos tricálcico $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_2]$ y éstas sales se depositan entre las fibras de colágeno, donde el proceso que rige esta deposición se denomina mineralización. La formación de los cristales de hidroxiapatita esta regulada por los osteoblastos.

Al inicio de la mineralización los cristales de sales minerales se van depositando dentro de las redes de colágeno. Cuando el hueso va madurando los cristales minerales incrementan en tamaño hasta formar la estructura totalmente rígida que constituye el hueso mineralizado.

1.4.3.2. Las células óseas

En el hueso existen principalmente dos tipos celulares; los osteoblastos y los osteoclastos. Existe un tercer tipo celular que deriva de la diferenciación terminal de los osteoblastos, llamados osteocitos.

Osteoblastos: son células derivadas de las células osteoprogenitoras y están involucrados en la formación del hueso, así como en el desarrollo y en el crecimiento óseo. Tienen una forma ovalada, con un núcleo excéntrico bien definido y un citoplasma basófilo. En cuanto a su morfología presentan un retículo endoplasmático rugoso (RER) abundante con una aparato de Golgi bien desarrollado y orgánulos. Estas células son las encargadas de la síntesis de los componentes orgánicos de la matriz tales como, las fibras de colágeno, la

osteocalcina, la osteopontina y demás proteínas involucradas en la formación ósea. Los osteoblastos también son células ricas en fosfatasa alcalina, una enzima de gran importancia en la formación del hueso.

La matriz más cercana al osteoblasto que no está calcificada se conoce como osteoide. El osteoide está compuesto únicamente por materia orgánica y principalmente por fibras de colágeno. Los osteoblastos son las encargadas de la calcificación de la matriz ósea mediante la secreción de pequeñas vesículas matriciales. Los osteoblastos se derivan de células progenitoras de origen mesenquimal (MSC). Éste tipo de célula tiene la característica de diferenciarse a miofibroblastos, fibroblastos, adipocitos, condrocitos u osteoblastos en función de los factores de crecimiento o diferenciación que intervengan [241,242] (figura 1.15).

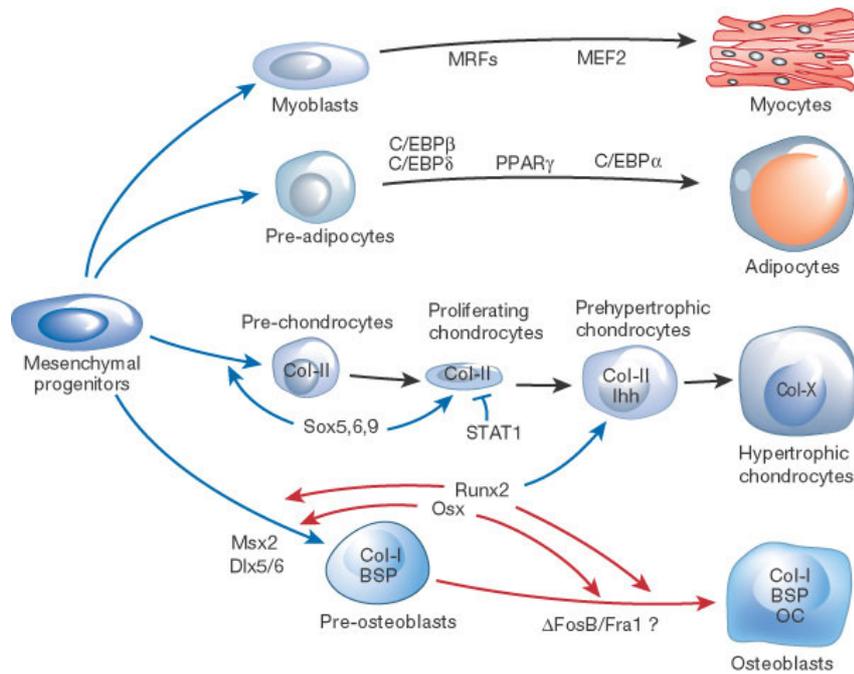


Figura 1.15. Proceso de diferenciación de osteoblastos, condrocitos, adipocitos y miocitos a partir de células progenitoras mesenquimales [242].

Osteoclastos: son células multinucleadas de gran tamaño de 20 a 100 μ m de diámetro, presentan una parte de su membrana arrugada en forma de cepillo rodeada de un citoplasma libre de orgánulos, con un aparato de Golgi bien desarrollado. Los osteoclastos son las encargadas de la resorción ósea por lo que su función se basa en la degradación y la reabsorción del hueso. En el proceso de resorción ósea, el aparato de Golgi excreta lisosomas que contienen la enzima fosfatasa ácida o más comúnmente conocida como Tartrate Resistant

Acid Phosphatase (TRAP) [243-245] en las proximidades de la membrana arrugada en forma de cepillo produciéndose las reacciones de degradación de la matriz antes de que el medio ácido disuelva las sales minerales del hueso

Osteocitos: son células óseas maduras, derivada de los osteoblastos y se encuentran en las lagunas osteocitarias rodeadas por la matriz que han segregado antes como osteoblasto. A diferencia de los osteoblastos, los osteocitos pueden conectarse entre si mediante las prolongaciones citoplasmáticas, situadas en los canículos y a través de las uniones GAP para llevar a cabo el intercambio de metabolitos e iones. Este sistema de conexión solo tiene lugar en una matriz que no esté mineralizada pues en una matriz mineralizada no se pueden mover [234].

Capítulo 2

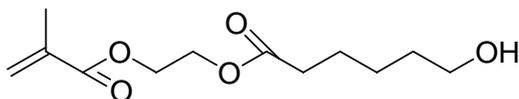
Parte Experimental

2. Parte experimental

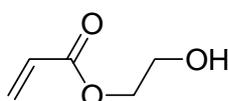
2.1. Materiales.

2.1.1. Monómeros

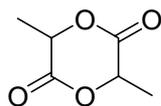
- Caprolactona 2-(metacrililoiloxi)etil ester (CLMA), suministrado por Aldrich.



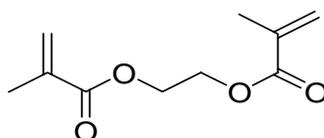
- Acrilato de 2-hidroxietilo (HEA), suministrado por Aldrich con una pureza del 96%.



- L-Láctido, suministrado por Aldrich con una pureza del 98%.



- Dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), suministrado por Aldrich con una pureza del 99%.



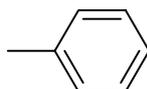
Este monómero fue utilizado como reticulante o entrecruzante en el proceso de polimerización.

2.1.2. Iniciadores

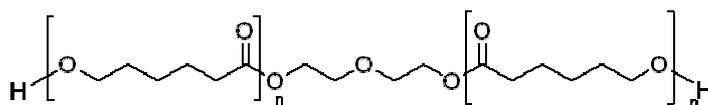
- 2,2'-Azobisisobutironitrilo (AIBN), suministrado por Aldrich con una pureza del 98%.



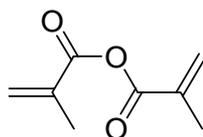
- Benzoina, suministrada por Scharlau con un 98% de pureza.

**2.1.3. Otros reactivos**

- Policaprolactona diol (PCL), con peso molecular 2000 Da, suministrada por Aldrich.



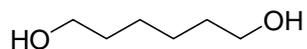
- Anhídrido Metacrílico (MA), suministrado por Aldrich.



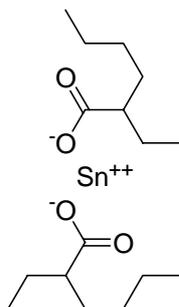
- Tripsina, suministrado por Sigma-Aldrich.

2. Parte experimental

- 1,6 hexanodiol, suministrado por Fluka con una pureza mayor del 95%.



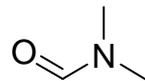
- 2-Etil-hexanoato de estaño, suministrado por sigma con una pureza del 95%.



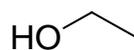
- Poli (metacrilato de metilo) en micro partículas esféricas de 90µm, Colacryl DP 300, suministrado por Quimidroga, S. A., fue utilizado como porógeno en la obtención de los scaffolds.
- Solución buffer de pH neutro con un 10% de formalina y un 4% de formaldehído, suministrado por sigma-aldrich. Dicha solución se utiliza para fijar las células y realizar ensayos de inmunocitoquímica.

2.1.4. Solventes

- N,N-Dimetilformamida (DMF), suministrada por Aldrich, con un grado de pureza del 99.8%.



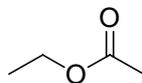
- Etanol, suministrado por Aldrich, con un 99.5% de pureza.



- Dioxano, suministrado por Aldrich, con un 99.8% de pureza.



- Acetato de etilo anhidro, suministrado por Aldrich, con un 99.8% de pureza.



- Agua destilada suministrada por Scharlau, de conductividad 10 μS fue usada en los estudios de hinchamiento.

2. Parte experimental

2.1.5. Células y medios utilizados en los cultivos

Células mesenquimales provenientes de médula ósea de cabras adultas (GBMCs), suministradas por el laboratorio 3B's Research Group in Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics, de la Universidad de Minho, Braga, Portugal.

Suero bovino-fetal (FBS) y la solución antibiótica-antimicótica (1% A/B), fueron suministrados por (Gibco, UK). La solución antibiótica-antimicótica contiene 10,000 unidades ml⁻¹ penicilina G sodio, 10,000 mgml⁻¹ sulfato de estreptomicina y 25 mgml⁻¹ anfotericina B.

Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suministrado por Sigma-Aldrich, enriquecido con un 10% de suero bovino-fetal (FBS) y un 1% de antibiótico-antimicótico.

Medio de diferenciación osteogénica Minimal Essential Medium Eagle, modificación alfa (α -MEM), suministrado por Sigma-Aldrich, enriquecido con dexametasona 10⁻⁸ M, 50 mgml⁻¹ de ácido ascórbico y β -glicerol fosfato (10 mM) todos estos reactivos suministrados por Sigma-Aldrich.

Medio MTS: El medio de cultivo DMEM, pero esta vez sin rojo fenol y sin FBS se mezcló con MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2(4-sulfofenil)-2H tetrasolium) en relación 5:1.

2.2. Técnicas Experimentales

➤ *Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).*

La caracterización química se llevo a cabo mediante resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN), modelo Bruker AMX 500 a 500 MHz.

➤ *Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR)*

Se caracterizaron las muestras mediante FTIR aplicando la técnica de reflexión total atenuada (FTIR-ATR), usando un Thermo Nicolet Nexus FTIR. Los espectros fueron obtenidos por la acumulación de 64 barridos en un rango de $650\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ con una resolución de 4 cm^{-1} .

➤ *Calorimetría diferencial de barrido (DSC).*

Las medidas de calorimetría diferencial de barrido de varias de las muestras obtenidas se realizaron en un equipo Mettler Toledo. Se utilizó como gas de purga nitrógeno con un flujo de 20 ml/min . La temperatura del equipo fue calibrada con indio y zinc. La entalpía de fusión del indio fue usada para calibrar el flujo de calor. Las medidas de DSC de las muestras de CLMA y sus copolímeros con acrilato de 2-hidroxietilo (HEA) fueron realizadas en el equipo Pyris 1 (PerkinElmer). En este caso también se utilizó como gas de purga nitrógeno con un flujo de 20 ml/min . La temperatura del equipo fue calibrada con indio y Zinc. La entalpía de fusión del indio fue usada para calibrar el flujo de calor.

2. Parte experimental

➤ *Análisis dinámico mecánico (DMA).*

El análisis dinámico mecánico de todas las muestras se realizó en el equipo Seiko DMS210, a la frecuencia de 1 Hz en el modo de tensión. La dependencia con la temperatura del módulo de almacenamiento (E') y la tangente de pérdida ($\tan \delta$) fueron medidos en el intervalo de temperaturas de $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

➤ *Análisis termogravimétrico (TGA).*

Los datos fueron obtenidos mediante un equipo TA-Instrument, modelo SDT-Q600. Las masas de las muestras estaban en el rango de 5-10 mg. Los valores de la pérdida de masa se midieron en función de la temperatura en el intervalo entre 50 y $750\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

➤ *Espectroscopía de relajación dieléctrica (DRS).*

Los análisis de DRS se han obtenido usando un analizador de impedancia Alpha-S. El control de temperatura se obtuvo mediante Quatro Cryosystem de Novocontrol GmbH. Las muestras con geometría cuadrada fueron introducidas entre dos electrodos planos metalizados con (diámetro 20mm). En los experimentos la permitividad dieléctrica compleja $\epsilon^* = \epsilon' - i\epsilon''$ fue calculada en función de la frecuencia ($10^{-1} - 10^7$ Hz), con un rango de temperaturas entre -50 y $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

➤ *Microscopía Electrónica de barrido (SEM).*

Las muestras fueron examinadas mediante el microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-5410, usando una criounidad Oxford CT 1500 para bajas temperaturas (cryoSEM). Antes de examinar las muestras, se introdujeron en

agua destilada durante 24 horas. Una vez hinchadas se introdujeron en nitrógeno líquido a bajas presiones (2×10^{-2} mbar) con el objetivo de congelar la red polimérica. Posteriormente, las muestras en estado congelado y a la temperatura de -150°C se fracturaron y fueron sometidas a alto vacío durante 15 minutos para que sublimara todo el agua que había sido incorporada mediante el hinchamiento y para evita el colapso de una posible estructura de poros.

➤ *Tomografía micro-computarizada (μ -CT)*

La información cualitativa de la arquitectura de los scaffolds de CLMA y poli (CLMA-co-HEA) fue obtenida por análisis de imágenes mediante técnicas de μ -CT, usando el equipo Scanco 20 (Scanco Medicals, Switzerland) con un nivel de penetración de rayos X de 50 kV. El barrido de rayos X fue adquirido en modo de alta resolución. El software Mimicss (Materialise, Belgium), fue utilizado para visualizar las secciones en 2D realizadas a los scaffolds. Se tomaron datos de 150 a 160 cortes separados por 7 micras lo que nos permitió realizar una reconstrucción tridimensional. Para el análisis de imagen se ha utilizado la herramienta-software propia EsTra [246,247] desarrollada bajo entorno MATLAB y adaptada para su uso en el análisis de biomateriales [248] como soporte en regeneración tisular.

➤ *Ensayos de compresión de los soportes porosos*

Los ensayos de compresión se realizaron en el equipo Microtest TPF-1D, con una célula de carga de 15 N. Las condiciones del ensayo se fijaron según la norma “ASTM D1621-00, Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Cellular Solid”, con una velocidad de deformación de 8

2. Parte experimental

$\mu\text{m}/\text{seg}$ a temperatura ambiente. Las dimensiones de los scaffolds fueron de 5 mm de diámetro y 3 mm de espesor.

➤ *Microscopía Confocal*

Las imágenes de microscopía confocal de la interacción células-scaffolds de CLMA fueron adquiridas mediante el equipo Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) de microscopía de barrido confocal con laser invertido, usando un objetivo de aceite (63X Plan-Apochromat-Lambda Blue 1.4 N.A).

➤ *Estudio de hinchamiento de las muestras*

A partir de las placas mencionadas en el apartado anterior se obtuvieron discos secos de 5 ± 0.05 mm de diámetro y 1 ± 0.05 mm de espesor que se sumergieron en 10 ml de agua destilada (pH=6.8) a una temperatura de 37°C . El estudio se llevó a cabo midiendo gravimétricamente el grado de hinchamiento w , el cual se expresa como la cantidad de agua por unidad de masa de polímero seco (xerogel):

$$w = \frac{m_{\text{water}}}{m_{\text{xerogel}}} \quad (1)$$

Los valores de hinchamiento reportados son los promedios de tres mediciones realizadas.

2.3. Sistemas poliméricos

2.3.1. Métodos 1. Obtención de redes de poli(CLMA-co-HEA)

2.3.1.1 Copolimerización de CLMA con HEA

Las redes poli y copoliméricas fueron sintetizadas por polimerización vía radical en solución, usando DMF como solvente (50 wt.-%). Las proporciones de ambos comonómeros se dan en la tabla 2.1. En la reacción hemos utilizado como agente entrecruzador el EGDMA al 1 wt.-% y como iniciador AIBN al 0.2 wt.-% con respecto a la masa total de los otros monómeros. Una vez terminado el proceso de polimerización, el que se llevó a cabo durante 24 horas a 50°C, se obtuvieron placas de copolímeros de poli(CLMA-co-HEA) de 1 mm de espesor, las cuales se lavaron en etanol a reflujo hasta eliminar totalmente monómero residual y oligómeros de bajo peso molecular en los materiales y posteriormente se secaron a vacío hasta peso constante. Las redes de homopolímero de CLMA se obtuvieron en las mismas condiciones.

Tabla 2.1. Composición de la mezcla de reacción

<i>% de CLMA</i>	<i>% de HEA</i>
100	0
70	30
50	50
30	70
0	100

2.3.1.2. Preparación de los scaffolds de poli(CLMAco-HEA).

Para la fabricación de los scaffolds de copolímeros de CLMA y HEA, se utilizó como plantilla (“template”) un sinterizado de esferas de polimetacrilato de metilo (PMMA) el cual se fabricó como se describe a continuación. Microesferas de PMMA de 90 micras de diámetro se introdujeron entre dos placas de vidrio a una temperatura de 180°C y una presión de 200 bar, durante 30 minutos. Para obtener reproducibilidad en los scaffolds a preparar, se midió el espesor de dicha primera plantilla. Posteriormente se vuelve a introducir en el molde y se comprime de nuevo a 180°C y 200 bar, durante 30 minutos y después de enfriado se calculó el grado de compresión (en éste caso 23%) por la disminución del espesor del “template”. Se prepararon las diferentes mezclas monoméricas y se introdujeron dentro de los espacios libres entre las esferas de PMMA.

Las mezclas monoméricas se prepararon de la misma forma que en el epígrafe 2.3.1.1, utilizando esta vez como iniciador la benzoína (1 wt.-%) y como agente entrecruzante EGDMA al 2 wt.-%. Las cantidades de ambos monómeros son los que se representan en la tabla 2.1. Las copolimerizaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente y en presencia de luz ultravioleta durante 24 horas. Una vez terminado el proceso, la plantilla de PMMA fue eliminada en un soxhlet, utilizando acetona como disolvente durante 24 horas. Una vez pasado este tiempo, la plantilla de PMMA se había disuelto completamente. Las muestras porosas obtenidas se sumergieron durante 24 horas en etanol para eliminar posibles restos del proceso de polimerización, dígame monómero residual u oligómeros de bajo peso molecular. Los materiales se secaron a vacío hasta peso constante antes de su caracterización. El mismo proceso fue utilizado en la fabricación de los homopolímeros de CLMA.

2.3.1.3. Cultivos celulares en los scaffolds de poli(CLMAco-HEA).

➤ Estudios de cultivos celulares “in vitro”

Las células utilizadas en el estudio fueron las células mesenquimales provenientes de médulas de cabra (GBMCs), las cuales se extrajeron de la cresta ilíaca de cabras adultas y cultivadas en flascos de 75 cm³ utilizando Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, USA) como medio de cultivo, suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) (Gibco, UK) y una solución de antibiótico-antimicótico (1% A/B, Gibco, UK) que contiene 10000 Uml⁻¹ penicilina G sodio, 10000 mg/ml de sulfato de estreptomicina y 25mg/ml de anfotericina. Cabe destacar que éste estudio fue realizado en el laboratorio 3B's Research Group—Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics, de la Universidad de Minho, Portugal.

➤ Cultivo de GBMCs en scaffolds de CLMA/HEA

Una vez llegado a una confluencia mayor del 80% (estado donde las células han proliferado hasta llenar el área de cultivo), las GBMCs, se desprendieron enzimáticamente del sustrato usando 3 ml de tripsina. Se preparó una suspensión celular y éstas fueron sembradas en los scaffolds de CLMA/HEA (esterilizados mediante radiación Gamma a 25 kGy), inyectando en cada muestra 50µl de dicha suspensión, que contenían 1x10⁵ células. Las células fueron inyectadas primero en los scaffolds y luego los constructos scaffold-células fueron incubados a 37°C con un 5% de CO₂ durante una hora.

Para inducir la diferenciación osteogénica de las células mesenquimales a osteoblastos, después del tiempo de incubación descrito anteriormente, los constructos fueron introducidos en placas de 48 pocillos no tratadas y se

2. Parte experimental

añadió medio de cultivo específico de diferenciación osteogénica hasta la cantidad de 700 µl en cada pocillo. El medio de cultivo fue renovado cada dos días. Los tiempos de cultivos realizados son 3, 7, 14, 21 y 28 días. Fueron utilizadas tres réplicas por cada muestra en el experimento.

➤ *Viabilidad celular*

Una vez pasado el tiempo de cultivos (3, 7, 14, 21 y 28 días), los constructos (scaffold-células) fueron transferidos a placas de 48 pocillos y lavados dos veces con PBS. El medio de cultivo DMEM, pero ésta vez sin rojo fenol y sin FBS se mezcló con MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2(4-sulfofenil)-2H tetrasolium) en relación 5:1 y posteriormente fue añadido hasta cubrir totalmente los materiales. Pasadas 3 horas de incubación con un 5% de CO₂ se extrajeron 100µl de medio y se depositaron en placas de 96 pocillos. La cuantificación se determinó mediante la lectura de absorbancia a 490 nm.

El ensayo de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2(4-sulfofenil)-2H tetrasolium), es un ensayo en el cual el substrato-MTS es bio-reducido a formazan (que es de color marrón) mediante enzimas dehidrogenasas, las cuales están activas en las células vivas. Este ensayo ha sido ampliamente utilizado en la determinación tanto de viabilidad como de proliferación celular. La intensidad del color del formazan está directamente relacionada con el número de células viables, por tanto a mayor intensidad de color, mayor número de células viables en los cultivos.

➤ ***Evaluación de la morfología de las GBMCs***

La morfología de las células de GBMCs en los scaffolds de CLMA/HEA en el experimento fue analizada mediante microscopía electrónica de barrido. Para ello después de cada período de cultivo, las muestras fueron extraídas del medio, lavadas con PBS y se fijaron las células con una solución de glutaraldehído al 2.5% durante una hora y posteriormente lavadas nuevamente con PBS dos veces y deshidratadas con una serie de soluciones hidroalcohólicas de diferentes concentraciones (10, 30, 50, 70, 80, 90% y etanol absoluto). Una vez terminado el proceso de deshidratación, las muestras fueron secadas a temperatura ambiente y recubiertas con oro para su posterior análisis.

➤ ***Determinación de la proliferación y diferenciación de las GBMCs.***

Se determinó la proliferación celular utilizando los constructos células/scaffolds a través de la cuantificación del DNA mediante ensayos fluorimétricos. Para ello, las muestras fueron traspasadas después de cada tiempo (3, 7, 14, 21 y 28 días) a micro tubos de 1.5 ml de capacidad que contenían 1 ml de agua pura y almacenadas a -80°C hasta su posterior determinación. Antes de la determinación del DNA, los conjugados fueron descongelados y puestos en el ultrasonido durante 15 minutos. Las soluciones de las muestras sonicadas y los estándares (solución de DNA comercial en buffer Tris-EDTA, en un rango de concentraciones de 0 a $2\ \mu\text{gml}^{-1}$) fueron colocadas en placas opacas de 96 pocillos, poniendo en cada uno $28,7\ \mu\text{l}$ de la muestra o el estándar, $71,3\ \mu\text{l}$ de solución de PicoGreen y $100\ \mu\text{l}$ de buffer Tris-EDTA. Se analizó cada muestra por triplicado. Las placas de 96 pocillos

2. Parte experimental

opacas fueron incubadas durante 10 minutos en la oscuridad y posteriormente se midió la fluorescencia en el lector ELISA (Biotek, USA), usando una longitud de onda de excitación de 490 nm y una de emisión a los 520 nm. Se realizó una curva de calibración a partir de los estándares y los valores de DNA fueron obtenidos a partir de dicha curva.

➤ *Detección de fosfatasa alcalina (ALP), osteocalcina y colágeno tipo I mediante Inmunocitoquímica*

Los constructos CLMA/HEA-células fueron lavados en solución salina de buffer fosfato (PBS), 0.1 M durante 5 minutos, fijados utilizando una solución de formalina durante 1 hora a 4°C y posteriormente lavados 2 veces en PBS. Las reacciones inespecíficas que pudieran tener lugar fueron bloqueadas utilizando una solución de bloqueo (BS) que contenía 8,9 mL de PBS (0,1 M), 1 mL de FBS (10%) y 0,1 mL de triton X-100 al 0,1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, los constructos de CLMA/HEA-células fueron incubados con el anticuerpo de ALP anti-humano preparado en ratón (R&D systems) o con el de colágeno tipo I anti-humano preparado en conejo (Chemicon International) o el de osteocalcina anti-humano, preparado en ratón (R&D systems) durante 1 hora a temperatura ambiente y 24 horas a 4°C. Una vez pasado este tiempo, los constructos fueron lavados 3 veces con PBS (0,1 M) y finalmente incubados con los anticuerpos secundarios correspondientes en cada caso en relación 1/200 en BS (para colágeno tipo I, Alexa Fluor 647 anti-conejo, para ALP, Alexa Fluor 555 anti-ratón, y para osteocalcina, Alexa Fluor 488 anti-ratón,) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron 3 veces con PBS en intervalos de 5 minutos después de la incubación y se añadió medio de montaje con DAPI

(4',6- diamidino-2-fenilindol diclorhidrato). Los constructos fueron examinados por microscopía confocal. Es de destacar que aunque los anticuerpos empleados son para ser utilizados en células humanas, también células de otras especies son afines a ellos y dentro de sus especificaciones (de todos los anticuerpos utilizados) están presentes las células de cabra.

➤ **Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados fue realizado mediante *t*-test student de dos muestras asumiendo varianzas iguales y mediante ensayos de ANOVA usando un único factor para comparar las muestras. Los datos se consideraron significativos cuando la probabilidad (*p*) < 0.05.

2.3.2. Métodos 2. Redes de copolímeros de poli(mCL-co-HEA)

2.3.2.1 Síntesis del macrómero de PCL (mCL)

El procedimiento de síntesis de mCL que se describe a continuación se ilustra en la figura 2.1.

La PCL diol con grupos hidroxilos α y ω terminales, fue modificada con grupos metacrilatos mediante una reacción de esterificación. Se disolvieron 10 g de PCL diol (M=2000 Da) en 50 ml de acetato de etilo anhidro en un balón de 3 bocas con capacidad de 100 ml bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadió gota a gota un exceso de anhídrido metacrílico (MA) (2 moles de MA por cada mol de PCL) a la disolución bajo agitación y a una temperatura de 0°C durante 2 horas y posteriormente 8 horas a reflujo y bajo atmósfera de nitrógeno. El avance de la reacción se siguió por cromatografía de placa delgada. Una vez cumplido el tiempo de reacción, el producto se precipitó en un exceso de etanol,

2. Parte experimental

se filtró y recristalizó varias veces para eliminar impurezas. Además el producto fue purificado mediante la técnica de cromatografía en columna, usando como fase estacionaria sílicagel 60 y como fase móvil acetato de etilo. Finalmente el producto se secó a 50°C durante 24 horas a vacío.

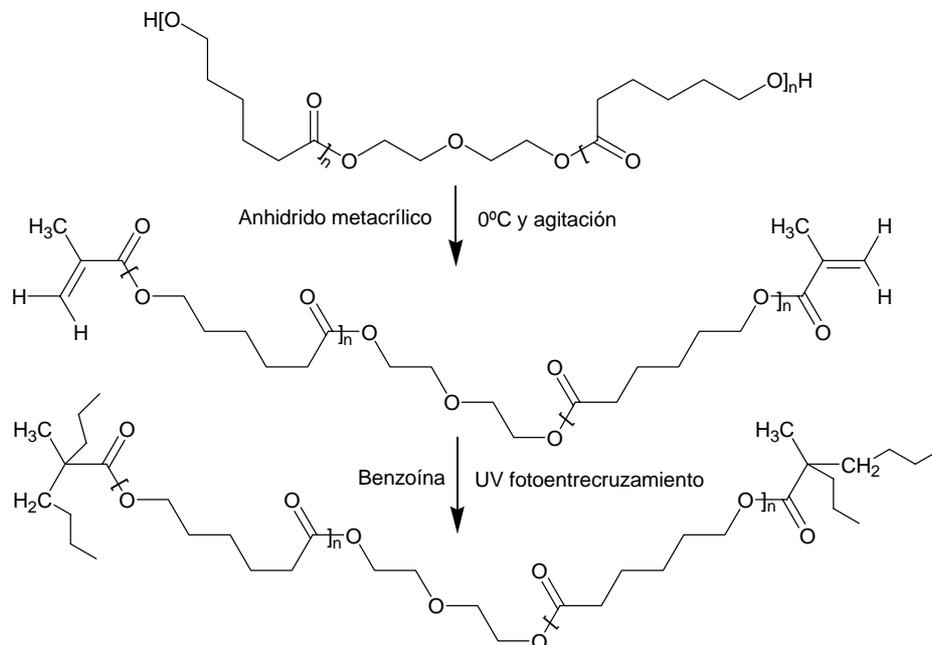


Figura 2.1. Esquema de síntesis de la funcionalización y entrecruzamiento de la PCL diol.

2.3.2.2 Redes de mCL

Las redes de mCL fueron preparadas mediante polimerización por vía radical iniciada bajo luz ultravioleta. El macrómero de PCL se disolvió en dioxano (35% (w/v)) y se mezcló con la benzoina (fotoiniciador 1 wt. %). La reacción transcurrió durante 24 horas bajo luz ultravioleta. Una vez obtenidas las muestras, éstas se lavaron en etanol a reflujo hasta eliminar totalmente el

monómero residual y oligómeros de bajo peso molecular que pudieran quedar de residuos de la polimerización y posteriormente se secaron a vacío hasta peso constante.

2.3.2.3 Redes de copolímeros de poli(mCL-co-HEA)

Las redes copoliméricas fueron obtenidas mediante copolimerización radicalica en solución, utilizando el dioxano (35% (w/v)) como disolvente y HEA como comonómero en diferentes proporciones como se indica en la tabla 2.2. El procedimiento después de la copolimerización es el descrito para las redes de mCL.

Tabla 2.2. Composición de la mezcla de reacción.

<i>% de mCL</i>	<i>% de HEA</i>
100	0
70	30
50	50
30	70
0	100

2.3.2.4. Preparación de los scaffolds de p(mCL)

Para la fabricación de los scaffolds de los copolímeros con las composiciones indicadas en la tabla 2.2, se utilizó como plantilla (“template”) un sinterizado de esferas de polimetacrilato de metilo (PMMA) el cual se fabricó como se describe a continuación. Las esferas de PMMA de 90 micras de

2. Parte experimental

tamaño de partícula se introdujeron entre dos placas de vidrio a una temperatura de 180°C durante 30 minutos. Para obtener reproducibilidad en los scaffolds a preparar, se midió el espesor de dicha primera plantilla. Posteriormente se volvió a introducir en el molde la plantilla y se comprimió de nuevo a 180°C durante 30 minutos y después de enfriado se calculó el grado de compresión (en éste caso 25%) por la disminución del espesor del “template”. Se preparó la mezcla de macrómero, iniciador (benzoína, 1 wt.-%) y solvente (dioxano, 18% (w/v)) y se introdujo dentro de los espacios libres entre las esferas de PMMA. La polimerización se llevó a cabo a temperatura ambiente y en presencia de luz ultravioleta durante 24 horas. Una vez terminado el proceso, la plantilla de PMMA fue eliminada en un soxhlet, utilizando acetona como disolvente durante 24 horas. Una vez pasado este tiempo, la plantilla de PMMA se había disuelto completamente. Las muestras porosas obtenidas e hinchadas en acetona, se les fue adicionando agua destilada (5% en volumen de cada 15 minutos) favoreciendo de esta manera el no colapso de la estructura porosa. Los materiales se secaron a vacío hasta peso constante antes de su caracterización.

2.3.3. Métodos 3. Redes de copolímeros de poli(mLA-co-HEA)

2.3.3.1 Síntesis de poli(L-láctido) diol

El procedimiento de síntesis del macrómero de L-láctido que se describe a continuación se ilustra en la figura 2.2.

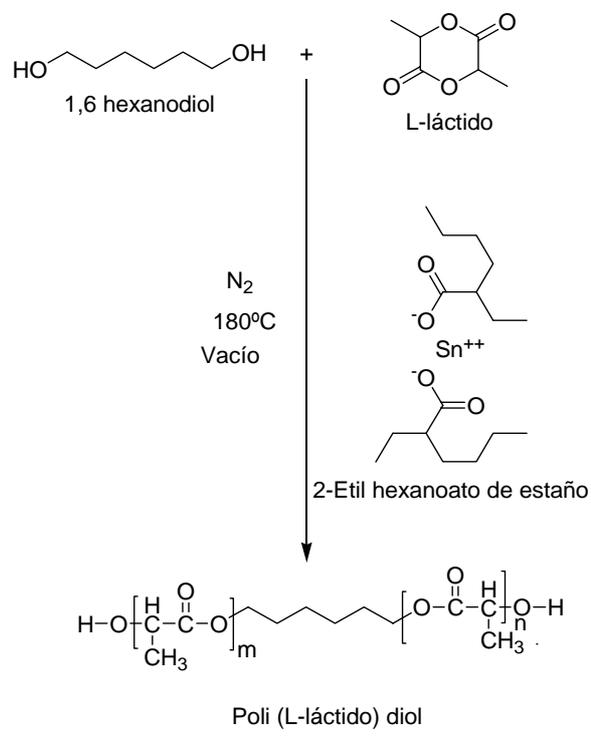
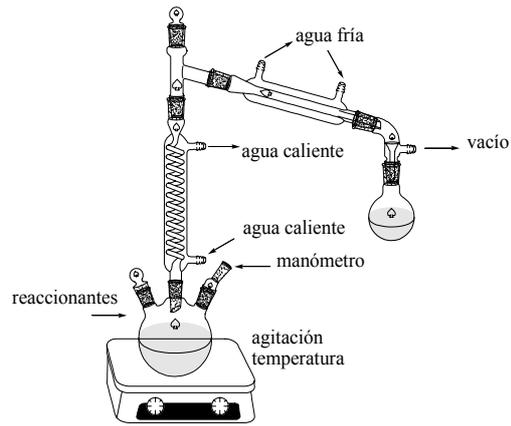


Figura 2.2. Esquema de síntesis de la obtención del poli(L-láctido) diol.

2. Parte experimental

0.409 g de 1,6 hexanodiol, 10 g de L-láctido (20 mol de L-láctido /mol de diol) y 21 mg de 2-etilhexanoato de estaño se introdujeron en un balón de 3 bocas de 50 ml. La mezcla de reacción fue fundida por calentamiento hasta los 110°C. Cuando se llegó a esta temperatura la reacción se comenzó a agitar y se aumentó la temperatura hasta los 180°C. El tiempo de reacción fue de 5 horas y en condiciones de vacío (430 mbar). Una vez transcurrido el tiempo de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente manteniendo la agitación. El producto resultante se disolvió en acetona y se precipitó en etanol frío, se filtró y se dejó secar a temperatura ambiente. El rendimiento fue mayor del 85%. Los grupos hidroxilos terminales α - y ω - del poli(L-láctido) diol fueron usados para la posterior síntesis del macrómero de poli(L-láctido) (ver figura 2.2).

2.3.3.2 Síntesis de un macrómero de poli(L-láctido) (mLA)

Los grupos hidroxilos terminales de poli(L-láctido) diol fueron utilizados para obtener un macrómero tetrafuncional. En un balón de tres bocas, 10 g de poli(L-láctido) diol (M=3500 Da), fueron disueltos en 100 mL de acetato de etilo anhidro. Dicha disolución se llevó a cabo en condiciones de agitación constante y a una temperatura de 0°C. Pasados 30 minutos, se añadió gota a gota un exceso de anhídrido metacrílico y se mantuvo las condiciones de reacción durante una hora. Pasado este tiempo, se aumentó la temperatura hasta 80°C por un periodo de tiempo de siete horas. En todo momento la reacción fue mantenida en ambiente de nitrógeno. La reacción fue en todo momento seguida mediante cromatografía de capa delgada.

El macrómero de poli(L-láctido), el cual denominaremos mLA, fue obtenido precipitando el producto de la reacción en exceso de etanol frío,

filtrado, recristalizado varias veces y además purificado mediante cromatografía de columna, usando sílica-gel 60 (tamaño de partícula de 70-230) como fase estacionaria y acetato de etilo como fase móvil. Finalmente, el precipitado se secó a 60°C y vacío durante 24 horas. La figura 2.3 representa gráficamente la reacción de metacrilación.

2. Parte experimental

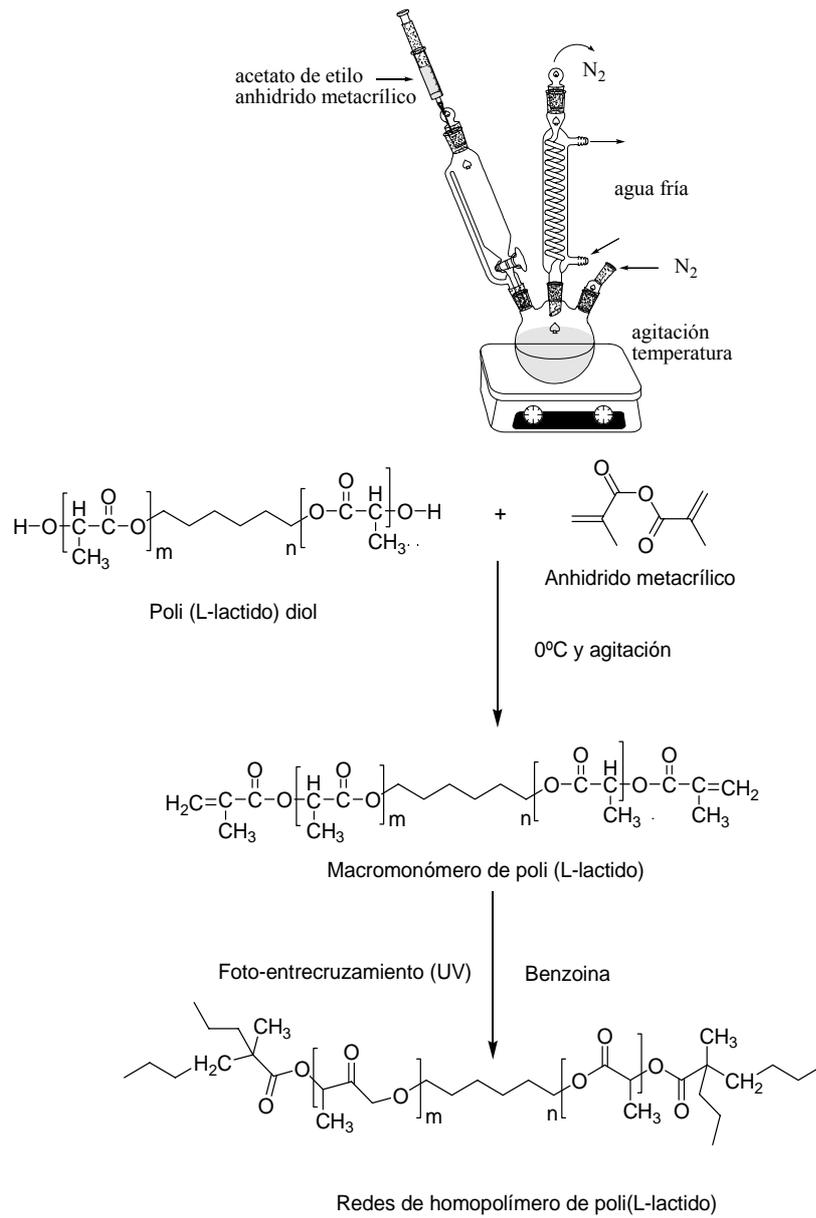


Figura 2.3. Esquema de síntesis de la obtención de las redes poliméricas de poli(L-láctido).

2.3.3.3 Redes de homopolímero de mLA

Las redes homopoliméricas del macrómero mLA fueron preparadas mediante polimerización vía radical iniciada por luz ultravioleta. El mLA se disolvió en dioxano (35% (w/v)) y se mezcló con la benzoina (fotoiniciador 1 wt. %). La reacción transcurrió durante 24 horas bajo luz ultravioleta. Finalizada la polimerización, las muestras se lavaron en etanol a reflujo hasta eliminar totalmente el monómero residual y oligómeros de bajo peso molecular que pudieran quedar de residuos de la polimerización y posteriormente se secaron a vacío hasta peso constante.

2.3.3.4 Redes de copolímeros de poli(mLA-co-HEA)

Las redes copoliméricas fueron obtenidas mediante copolimerización radicalica en solución, utilizando el dioxano (35% (w/v)) como disolvente y HEA como comonómero en diferentes proporciones como se indica en la tabla 2.3. El procedimiento después de la copolimerización es el mismo descrito para las redes de mLA (apartado 2.3.3.3).

Tabla 2.3. Composición de la mezcla de reacción.

<i>% de mLA</i>	<i>% de HEA</i>
100	0
70	30
50	50
30	70
0	100

2. Parte experimental

2.3.4. Métodos 4. Redes de copolímeros de mCL y mLA

2.3.4.1 Síntesis de redes copoliméricas de los macrómeros de mCL y mLA

Las redes copoliméricas de los macrómeros de mCL y mLA, en distintas proporciones, como se indica en la tabla 2.4, fueron obtenidas mediante copolimerización radicalica en solución, utilizando el dioxano (35% (w/v)) como disolvente y la benzoina como foto iniciador (1 wt. %). El procedimiento después de la copolimerización es el mismo descrito para las redes de macrómeros de mCL y mLA (apartados 2.3.2.2 y 2.3.3.3 respectivamente).

Tabla 2.4. Composición de la mezcla de reacción de ambos macrómeros.

<i>% de mCL</i>	<i>% de mLA</i>
100	0
70	30
50	50
30	70
0	100

Capítulo 3
Resultados y discusión

3.1 Desarrollo de nuevas redes a base de Caprolactona 2-(metacrililoiloxi) etil éster (CLMA)

Las modificaciones químicas de la ϵ -caprolactona y como consecuencia sus nuevas propiedades es uno de los objetivos principales de este trabajo. Su modificación mediante la reticulación y la incorporación de grupos acrilato hidrófilos permite obtener membranas para diferentes aplicaciones, entre ellas la ingeniería tisular ya que, como se verá más adelante la pérdida en cuanto a la adhesión celular que suele acompañar al aumento de la hidrofiliidad del material no se produce en este caso.

Como se ha comentado en el epígrafe 2.3.1.1 se sintetizaron copolímeros de CLMA con HEA en diferentes composiciones y sus respectivos homopolímeros. La reacción de copolimerización se ilustra en la figura 3.1.

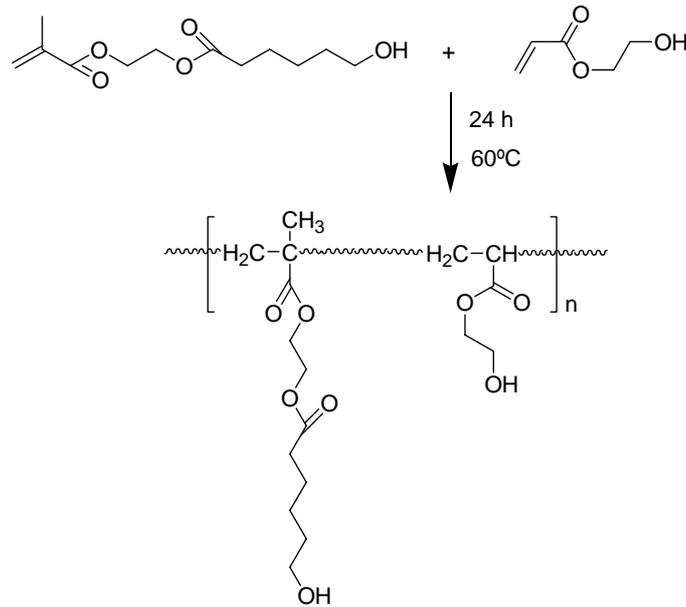


Figura 3.1. Reacción de copolimerización de CLMA y HEA.

La figura 3.2 muestra los espectros infrarrojos (FTIR-ATR) de los copolímeros sintetizados y el homopolímero de CLMA.

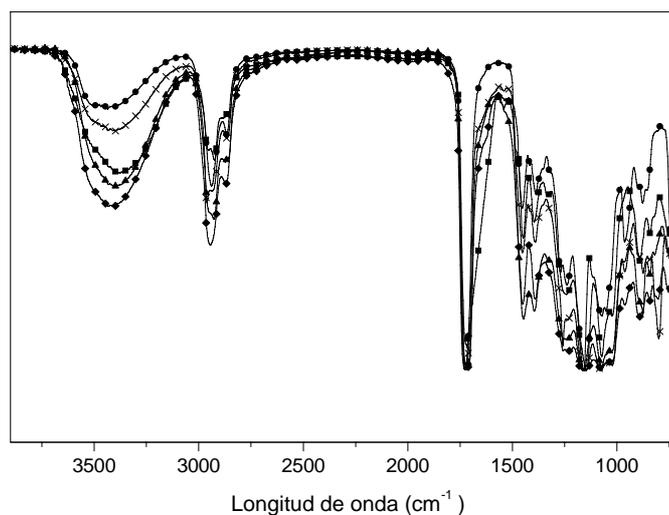


Figura 3.2. FTIR-ATR de PCLMA, PHEA y los copolímeros: (■) PHEA, (▲) composición de 30/70, (◆) composición de 50/50, (x) composición de 70/30 CLMA/HEA, (●) PCLMA.

Las bandas situadas entre 3500-3200 cm^{-1} son las debidas a las vibraciones de valencia C-O-H de los grupos hidroxilos que se intensifican por el incremento de HEA en los copolímeros, hasta llegar a un contenido de HEA del 50%, a partir de allí la densidad de grupos hidroxilo empieza a decrecer posiblemente debido a la presencia de nanoporos.

También son significativas las bandas en 1723 cm^{-1} correspondiente a la vibración del grupo carbonilo (C=O) y las localizadas aproximadamente a 2950-2900 cm^{-1} debido a las vibraciones simétricas y antisimétricas de CH_3 y CH_2 .

La figura 3.3 muestra los termogramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de las redes de PCLMA y los copolímeros con HEA.

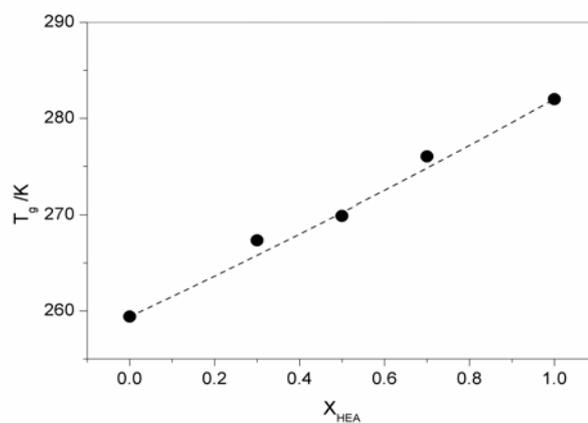
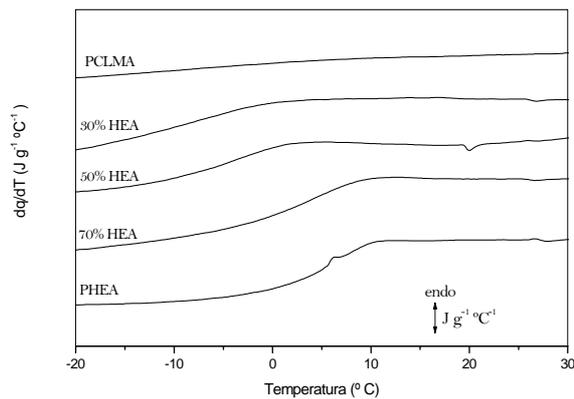


Figura 3.3. Curvas de DSC calentando a $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de las redes de PCLMA, PHEA y los copolímeros (arriba) y relación entre la fracción másica de HEA y la T_g de los copolímeros (abajo). La línea corresponde a la predicción de la ecuación de Gordon-Taylor [249].

Solo se representa el intervalo de temperaturas alrededor de la temperatura de transición vítrea (T_g). Como era de esperar, no se detectaron picos de fusión a altas temperaturas debido a que el tamaño de la unidad de la

3. Resultados y discusión

ϵ -caprolactona que cuelga de la cadena principal es muy corta (1 unidad en el grupo lateral) y no son capaces de cristalizar, por lo tanto podemos concluir que las muestras eran completamente amorfas.

Se observa un solo escalón en el flujo de calor, correspondiente a la T_g (tabla 3.1) de cada muestra, el cual se desplaza a altas temperaturas con el incremento de contenido de HEA en los copolímeros. No se observó separación de fases en ninguna de las muestras realizadas, que se detectaría por la aparición de una doble transición vítrea, en el intervalo de temperaturas del experimento

La relación entre la T_g y la fracción másica de HEA se representa en la figura 3.3 (abajo). La línea a trazos representada en el gráfico corresponde a la predicción de la ecuación de Gordon-Taylor [249] para redes homogéneas.

$$\frac{1}{T_g} = \frac{w_{HEA}}{T_{gPHEA}} + \frac{1 - w_{HEA}}{T_{gPCLMA}} \quad (2)$$

En ésta ecuación w_{HEA} es la fracción másica de HEA en el copolímero, $T_{gPHEA} = 288$ K, la temperatura de transición vítrea de redes de homopolímero de PHEA y $T_{gPCLMA} = 265$ K, la temperatura de transición vítrea de PCLMA obtenida por nosotros.

Los resultados experimentales sugieren que el nuevo material es homogéneo a escala nanométrica y esto unido a los resultados descritos en la figura 3.3 demuestran que los copolímeros de poli(CLMA-co-HEA) presentan una sola T_g que se desplaza hacia altas temperaturas desde el homopolímero de PCLMA hasta el homopolímero de HEA, demostrando una vez más la homogeneidad de las redes preparadas.

Los valores de la T_g de los homopolímeros de PCLMA y PHEA así como los valores de los copolímeros se han incluido en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Composición, temperatura de transición vítrea, T_g y coeficientes de difusión aparente de los copolímeros poli(CLMA-co-HEA).

<i>HEA (wt %)</i>	<i>T_g ($^{\circ}\text{C}$)</i>	<i>$D_{\text{ap}} \times 10^7$ (cm^2/s)</i>
0	-13.6	2.34
30	-5.7	3.57
50	-3.1	4.69
70	3.1	4.86
100	9	8.39

Los estudios de degradación térmica de los homopolímeros de PHEA y PCLMA mostraron un mecanismo de tres pasos, representado como tres picos en el termograma de la figura 3.4, no siendo así para las redes copoliméricas donde el proceso de degradación térmica ocurrió en dos pasos.

3. Resultados y discusión

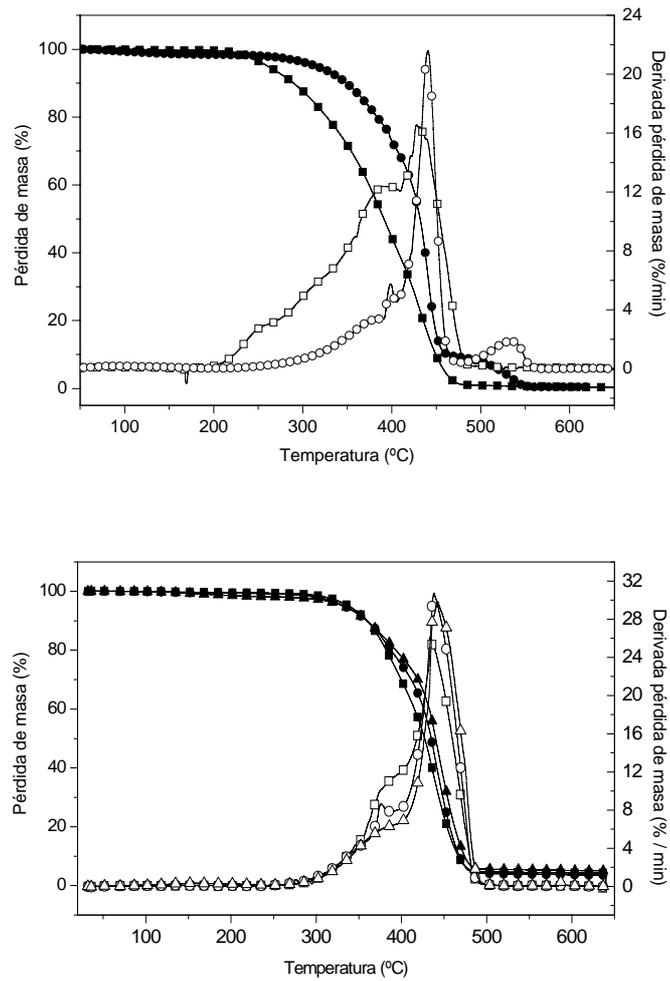


Figura 3.4. Representación de la pérdida de masa y su derivada con respecto a la temperatura de los homopolímeros de PHEA (●), PCLMA (■) (arriba) y de los copolímeros de poli (CLMA-co-HEA) 70/30 (■), 50/50 (●),30/70 (▲) (abajo).

Estas curvas no solo reflejan el proceso de degradación térmica del material sino que también nos da información acerca de la presencia en las redes, de algunos productos de reacción que hayan quedado atrapados después del proceso de lavado, reflejándose en el gráfico con una pérdida de masa por debajo de los 200°C. Es de destacar que dicha pérdida de masa no se detectó ni en los homopolímeros ni tampoco en los copolímeros. La degradación térmica de la red de p(CLMA) empieza aproximadamente en 230°C y se completa en los 485°C. En el caso de los copolímeros, son más estables térmicamente comenzando su proceso de degradación a la temperatura de 300°C y culminando a los 500°C. Para el PHEA el intervalo es entre 280°C y 550°C. El rango de la pérdida de masa se aprecia mejor en el gráfico de la derivada de pérdida de masa. En este caso usando los máximos de las curvas caracterizamos los diferentes estados en el proceso de degradación. Así, la pérdida de masa de la red de p(CLMA) se produce en tres pasos, los cuales llamaremos $\beta_1(255^\circ\text{C})$, $\beta_2(385^\circ\text{C})$ y $\beta_3(428^\circ\text{C})$. Para el caso de las redes de PHEA procede también en tres etapas $\chi_1(390^\circ\text{C})$, $\chi_2(450^\circ\text{C})$ y $\chi_3(535^\circ\text{C})$. En el caso de los copolímeros podemos identificar tan solo dos etapas, $\gamma_1(380^\circ\text{C})$ y $\gamma_2(440^\circ\text{C})$.

Como muestran los resultados de degradación de los copolímeros nos podemos dar cuenta que no es una superposición de la cinética de los componentes puros (homopolímeros) y esto puede ser explicado calculando la predicción de la curva de TGA, por ejemplo, del copolímero 50/50 a partir de los homopolímeros puros, realizando una superposición ponderada (figura 3.5).

3. Resultados y discusión

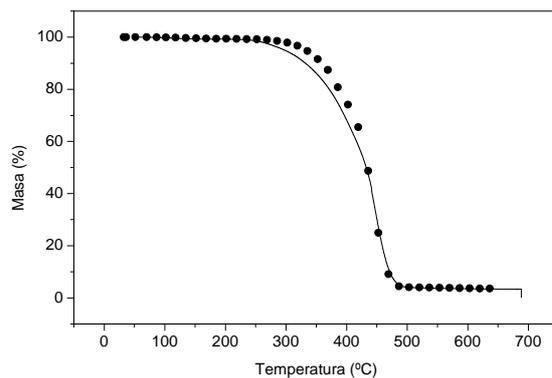


Figura 3.5. Comparación entre la pérdida de masa de los datos experimentales del copolímero poli(CLMA-co-HEA) (50/50) (●) y la curva teórica (línea), calculada a partir de los homopolímeros estudiados.

El carácter hidrófilo fue analizado mediante el cálculo de la absorción de agua de cada muestra en agua destilada. La figura 3.6 representa la relación entre la absorción de agua referida a la masa de las muestras secas w en función del tiempo de inmersión en agua a 37°C.

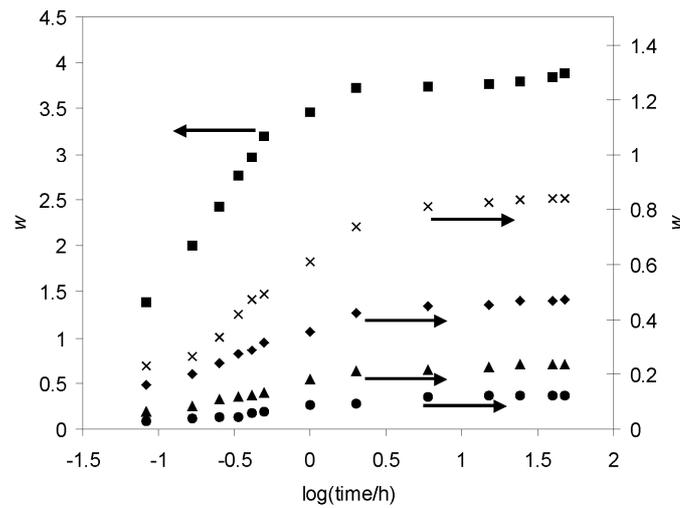


Figura 3.6. Ganancia de agua en función del tiempo a 37°C. (■) PHEA, (x) CLMA/HEA 30/70, (◆) 50/50, (▲) 70/30, (●) PCLMA.

Para tener una idea de las características de transporte del agua en las muestras, se calculó el coeficiente de difusión aparente D_{ap} siguiendo la segunda ley de Fick, aún cuando esta ley no es de esperar que se ajuste a nuestros materiales debido al gran incremento del volumen de la muestra durante el proceso de absorción.

Los valores de D_{ap} provienen de la siguiente ecuación [250]:

$$\frac{\Delta m_t}{\Delta m_\infty} = \frac{4}{\sqrt{\pi}} \sqrt{\frac{tD_{ap}}{l^2}} \quad (3)$$

3. Resultados y discusión

donde: Δm_t y Δm_∞ , son las ganancias de masa a un tiempo t y en el equilibrio respectivamente y l es el espesor de las muestras. Esta ecuación en el caso de la difusión Fickiana, es una aproximación de la solución de la ecuación de difusión siguiente [250]:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_{ap} \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (4)$$

donde: C es la concentración de agua en la muestra, x es la distancia y t es el tiempo.

Los coeficientes de difusión aparente fueron calculados a partir de la ecuación 3 y se recogen en la tabla 3.1. Como se puede comprobar, la muestra de PCLMA, presenta poca absorción por lo que podemos decir que tiende a ser un material de características hidrófobas debido a la ausencia del OH del metacrilato de 2 hidroxietilo (HEMA) por el enlace éster que tiene con las unidades de ϵ -caprolactona en su estructura química. El máximo de hinchamiento del PCLMA es $w=0.1$. Por otro lado, a medida que los copolímeros tienen más contenido de HEA aumenta el hinchamiento debido a la incorporación de OH en sus estructuras. También pudimos comprobar que nuestro valor de D_{ap} para el homopolímero de PHEA fue de $8.3 \cdot 10^7 \text{ cm}^2/\text{s}$, mucho mayor que los reportados en la literatura [251,252] para PHEA polimerizado en masa ($3.4 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$) y el material poroso ($2.1 \times 10^7 \text{ cm}^2/\text{s}$). La explicación a este comportamiento es la nanoestructura de nuestras muestras obtenidas como consecuencia del proceso de polimerización en solución de los mismos (figura 3.7).

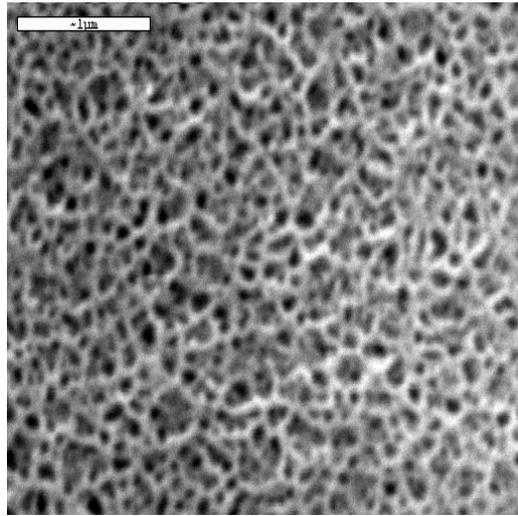


Figura 3.7. Micrografía de microscopía electrónica de barrido (SEM) de PHEA en inmersión en agua hasta el equilibrio. La muestra fue criogénicamente fracturada y el agua fue sublimada a $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ con alto vacío durante 15 min.

El incremento del coeficiente de difusión aparente ha sido relacionado con la porosidad de las muestras. Al aumentar el componente hidrófilo en los copolímeros (aumento del contenido de HEA) aumenta el coeficiente de difusión y debía ocurrir todo lo contrario si la muestra no fuera porosa, porque se crean enlaces por puentes de hidrógeno entre el agua y los grupos OH del PHEA, retardando el flujo del líquido en el material. Además habría que tener en cuenta también la disminución del D_{ap} a causa de la dificultad de la difusión del agua en la muestra debido a los procesos de relajación asociados a la apertura de poros cuando éstos están colapsados en estado seco [253]. La

3. Resultados y discusión

situación en nuestro caso es diferente porque los poros están abiertos (no colapsados) en el estado seco, con lo que la absorción de agua es más rápida y el coeficiente de difusión mayor. La porosidad de nuestras muestras fue calculada tanto en estado seco como en estado hinchado en el equilibrio.

La fracción de volumen de poro en el hidrogel hinchado se define como:

$$\phi_s = \frac{V_{pores}}{V_{pores} + V_{swollen\ polymer}} \quad , \quad (5)$$

y puede ser calculada a partir de la siguiente ecuación:

$$\phi_s = \frac{v_{water} (W - w_B)}{v_{swollenB} (1 + w_B) + v_{water} (W - w_B)} \quad , \quad (6)$$

Donde v_{water} es el volumen específico del agua pura, $v_{swollenB}$ y w_B son el volumen específico y la absorción de agua de la muestra hinchada no porosa con la misma densidad de entrecruzamiento y w es la absorción de agua de la muestra porosa después de inmersión. $v_{swollenB}$ fue estimada estimada considerando que el volumen de exceso en la mezcla polímero/agua es nulo

$$v_{swollenB} = v_{water} \omega_B + v_B (1 - \omega_B) \quad , \quad (7)$$

donde v_B es el volumen específico de la muestra no porosa en el estado seco, ω_B es la fracción másica del agua en la muestra en el estado hinchado. El valor de

la porosidad fue de $\phi = 0.48$ para las redes de PHEA. La porosidad en el estado seco,

$$\phi_d = \frac{V_{pores}}{V_{pores} + V_{dry\ polymer}} \quad (8)$$

fue calculada por la vía de la densidad aparente,

$$\phi_d = 1 - \frac{v_B}{v_{ap}} \quad (9)$$

donde v_{ap} es el volumen específico aparente de la muestra porosa obtenido experimentalmente. La porosidad por esta vía es de $\phi_d = 0.47$, lo que concuerda con ϕ_s .

Esto sugiere la presencia de un material poroso en su estado seco. Es interesante además decir que la fracción en volumen de poro es igual a la cantidad de solvente usado en la polimerización. Esto está íntimamente relacionado con el hecho de que la DMF es un mal solvente del PHEA y es un buen solvente de las redes de PCLMA con lo que después de la polimerización de éste último se obtiene un material no poroso, debido a que no existe separación de fases entre el polímero y el solvente. Para los copolímeros, incluso con un 50% de HEA en la mezcla, la estructura final no presenta poros, solo para contenidos de HEA superiores a 70% se observa en el SEM una estructura de nanoporos. Esto se correlaciona con las bandas de OH presentes en los espectros de infrarrojos. Estas bandas se incrementan con el contenido de HEA en los copolímeros, no siendo así en el caso de copolímero con un 70% de HEA, en el cual la banda decrece, efecto producido por la disminución del

3. Resultados y discusión

número de grupos OH por unidad de volumen debido a los nanoporos de la estructura.

El contenido de agua en el equilibrio fue calculado a partir de la figura 3.6 a valores de tiempos elevados. La figura 3.8 representa su comportamiento en relación al contenido de HEA en los copolímeros. Como era de esperar, a mayor contenido de HEA en las muestras, es mayor la cantidad de agua absorbida por éstas. El contenido de agua viene expresado como la masa de HEA en el copolímero descontado la cantidad de agua absorbida por las redes de PCLMA.

$$W' = \frac{m_{water} - m_{water}^{CLMA}}{m_{xerogel} \cdot x_{HEA}} \quad (10)$$

Los resultados del contenido de agua calculados están reflejados en la figura 3.8. Se puede ver que el contenido de agua en el equilibrio obtenido para el PHEA es mayor que el reportado en la literatura [254]. Esto puede ser explicado por la nanoestructura obtenido como consecuencia de la polimerización en DMF como se ha explicado anteriormente.

Debido a efectos sinérgicos con las unidades de CLMA, una unidad de HEA tiene la suficiente habilidad como para coordinarse con las moléculas de agua dependiendo de la composición del copolímero. Este efecto puede ser no esperado cuando las unidades de HEA se agregan unas cerca de otras, brindando un aumento de micro o nanofase con la misma hidrofiliidad que el PHEA polimerizado en masa. Todo esto sugiere una distribución homogénea al azar de unidades de CLMA y HEA en los copolímeros

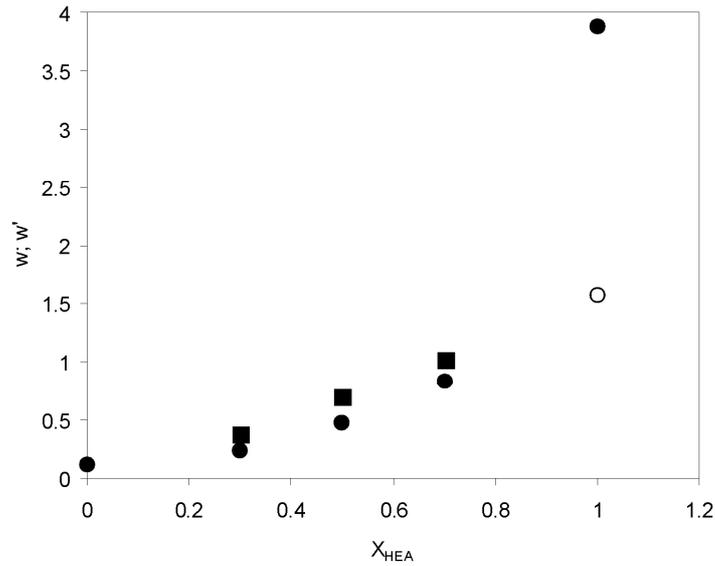


Figura 3.8. Absorción de agua en el equilibrio w por unidad de masa de polímero (●) y por unidad de masa de HEA en el copolímero (■). El círculo abierto corresponde a w del PHEA polimerizado en masa.

3.1.1 Arquitectura y propiedades de scaffolds de pCLMA y p(CLMA-co-HEA).

Otro de los objetivos de éste trabajo ha sido la obtención de materiales tridimensionales con estructura de poros interconectados con las mismas composiciones químicas que los materiales estudiados anteriormente. Como se ha descrito en el apartado 2.3.1.2, los scaffolds fueron obtenidos, utilizando las mismas composiciones estudiadas e inyectando la mezcla monomérica sobre

3. Resultados y discusión

una plantilla o template, siendo éste posteriormente disuelto y obtenido el material poroso.

La figura 3.9 ilustra las micrografías de SEM obtenidas de los scaffolds realizados, donde se puede observar las estructuras tridimensionales de poros interconectados.

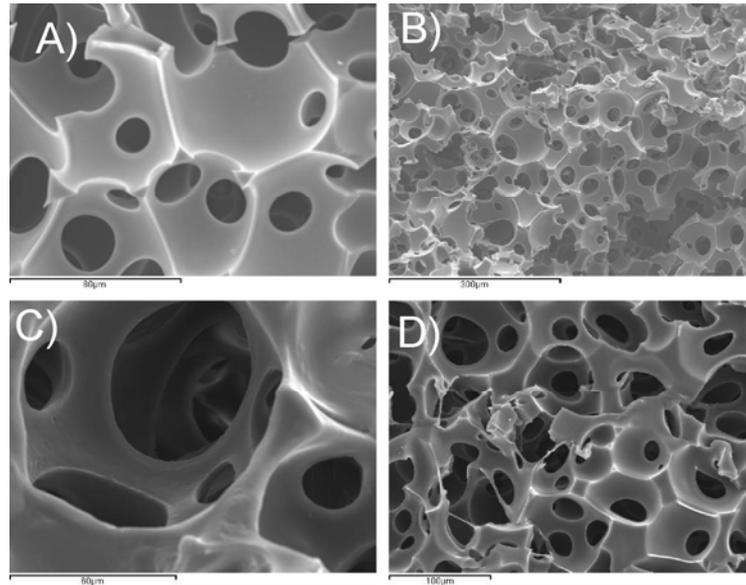


Figura 3.9. Micrografías de SEM de scaffolds de copolímeros de CLMA/HEA a diferentes magnificaciones A) PCLMA; B) 30% HEA; C) 50%HEA; D) 70%HEA.

La misma arquitectura porosa fue obtenida para todo el rango de composiciones, desde las muestras de PHEA (no mostradas) hasta las PCLMA, donde el diámetro de poros están entre 90-120 μm , lo que no depende de la

composición de los copolímeros sino del tamaño de las partículas de PMMA utilizadas como porógeno en la confección de la plantilla. Esta es la razón de que podamos variar el tamaño y conectividad del poro, modificando tanto el tamaño de las esferas de porógeno como su proceso de sinterizado en el cual variando la temperatura y presión de contacto entre las esferas podemos obtener diferentes estructuras [255]. Este es uno de los ejemplos donde podemos obtener materiales con diferente porcentaje de porosidad. Por otro lado es importante destacar que dichos poros son necesarios para el transporte de nutrientes que necesitaran las células en su regeneración dentro del scaffold.

La tensión superficial y el contenido de agua en el equilibrio son dos de los parámetros a los que afecta la composición química de los materiales y específicamente a la incorporación de grupos OH en las mezclas. El incremento de la capacidad de absorción debido a la incorporación de unidades de HEA aumenta la capacidad del material en términos de transporte de nutrientes y factores de crecimiento hacia el interior del scaffold, pero también es cierto que disminuye la adhesión celular, por lo que se debe tener en cuenta este balance.

La estructura interna de los materiales se caracterizó mediante técnicas de tomografía micro-computarizada (μ -CT), la cual nos permite obtener una medida cuantitativa del tamaño de poro y la interconectividad. La figura 3.10 muestra las imágenes de los cortes de las distintas secciones, que concuerdan con las fotos de SEM obtenidas y que nos permite calcular la porosidad que en éste caso en particular está entre el 70 y 80% (ver tabla 3.2).

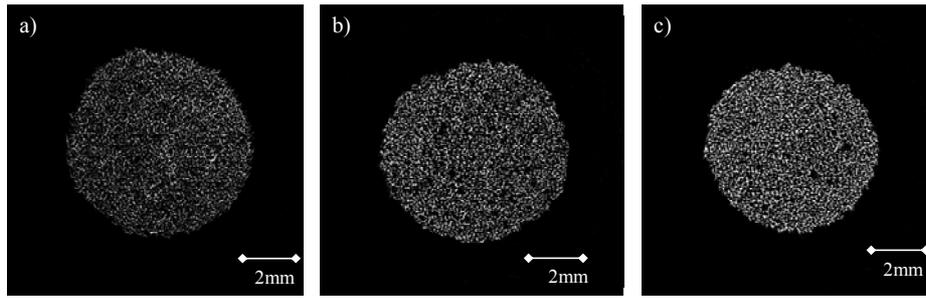


Figura 3.10. Imágenes de cortes transversales de μ -CT de poli(CLMA) (a) y poli(CLMA-co-HEA) con 30 y 50% de contenido de HEA (b y c) respectivamente.

La distribución de tamaño de poros para la muestra de poli(CLMA) se representa en la figura 3.11. Dicha distribución se obtuvo mediante el análisis de las imágenes de la figura 3.10 utilizando la herramienta-software propia EsTra [246,247] desarrollada bajo entorno MATLAB y adaptada para su uso en el análisis de biomateriales [248] como soporte en regeneración tisular. En ella se observa que el diámetro de poro es de alrededor de 90 μm , lo cual concuerda con el tamaño de porógeno utilizado en la preparación de los scaffolds. Es de destacar que en las demás composiciones el comportamiento fue el mismo, lo cual nos indica que la arquitectura del scaffold no se afecta con la composición química y sí en algunos casos con la contracción del polímero en el proceso de secado después de eliminar el porógeno [255].

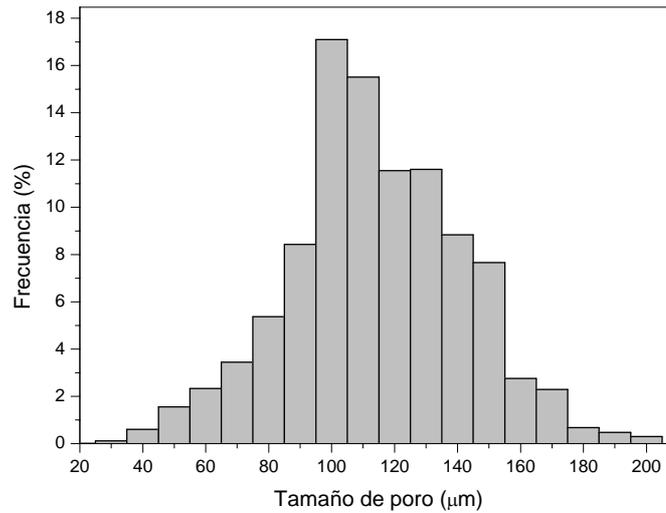


Figura 3.11. Distribución de tamaño de poro para los scaffolds de poli(CLMA).

3.1.2 Determinación de propiedades mecánicas de los scaffold mediante ensayos de compresión.

En un ensayo de compresión, el comportamiento típico de un material poroso tridimensional pasa por 4 etapas fundamentales. (1) una región inicial de contacto de la muestra con las mordazas, (2) seguida de una zona de comportamiento elástico lineal, (3) para pasar a una región donde se producen tensiones y grandes deformaciones con poco aumento de la tensión (plateau), producido por un mecanismo llamado “*buckling*” (donde las paredes del scaffolds se empiezan a doblar) y finalmente (4) la última región donde la

3. Resultados y discusión

deformación aumenta debido al colapso o densificación de la estructura porosa [256, 257] (ver figura 3.12).

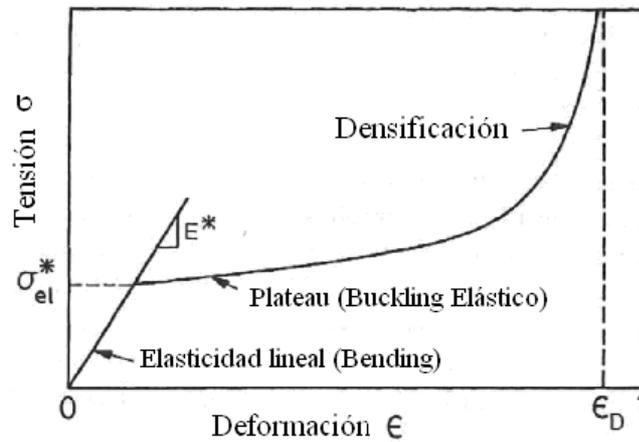


Figura 3.12. Curva teórica de tensión-deformación en compresión de una espuma elastomérica [257]

A partir de la pendiente de la región lineal se calcula el módulo de Young experimental. En la figura 3.13 se representa la curva de tensión-deformación en compresión de los scaffolds de poli(CLMA). Como se puede observar aparentemente la curva presenta tan solo dos etapas, pero en la ampliación del gráfico se observan tres etapas, una primera donde hasta el valor de 10% se observa una pendiente la cual interpretamos como la zona lineal, posteriormente alrededor del 10% se ve un pequeño cambio de pendiente y el material entra en la zona de buckling y en torno al 35% empieza la densificación. Es de destacar que las muestras que contienen el 30 y el 50% de HEA presentaban prácticamente el mismo comportamiento.

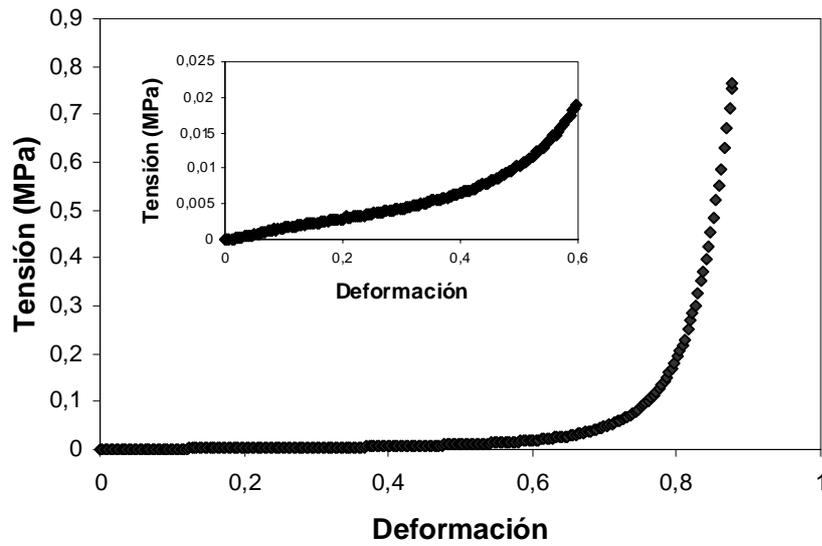


Figura 3.13. Curva experimental de tensión-deformación en compresión de los scaffolds de poli(CLMA).

El módulo de Young calculado a partir de la zona lineal de la curva para todas las muestras estudiadas se representa en la tabla 3.2.

3. Resultados y discusión

Tabla 3.2. Valores de la T_g , porosidad medida en los ensayos de μ -CT y del módulo de Young experimental de las curvas de tensión-deformación.

<i>muestras</i>	T_g ($^{\circ}C$)	<i>Porosidad</i> (μCT)	$E(MPa)$
Poli(CLMA)	-10	0.817	0.0380
Poli(CLMA-co-HEA) (70/30)	-8	0.798	0.0360
Poli(CLMA-co-HEA) (50/50)	-6	0.728	0.010

Como se puede observar los valores del módulo son muy bajos y además decrecen con el aumento del contenido de HEA en las muestras. Esto puede ser debido a que al aumentar el contenido de HEA en los sistemas copoliméricos la longitud de la cadena efectiva entre puntos de entrecruzamiento aumenta lo que hace disminuir el módulo elástico de acuerdo con la teoría clásica de la elasticidad de la goma.

3.1.3 Estudio del comportamiento de las GBMCs “in vitro” en los scaffolds sintetizados.

3.1.3.1 Adhesión, proliferación y diferenciación de las GBMCs en los scaffolds de poliCLMA y poli(CLMA-co-HEA)

Una vez analizada la arquitectura de los scaffolds, procedimos al cultivo de células en dichos materiales. Para ello y como se describe en el apartado 2.3.1.3, se utilizaron células mesenquimales provenientes de médula ósea de cabra, las cuales llamaremos GBMCs. En esta parte del trabajo nos planteamos varios objetivos:

1. Evaluar la adhesión, proliferación y diferenciación celular en los scaffolds utilizados, con porosidad y distribución de tamaño de poro aproximadamente constante.
2. Determinar si la composición química de las muestras –la variación sistemática de la hidrofiliidad del sistema –influye en los parámetros antes descritos.

Se inyectó un volumen de 50µL en cada muestra el cual contenía una suspensión de 1×10^5 células en medio de cultivo. Pasada 1 hora de incubación a 37°C, las muestras fueron introducidas en otras placas con medio de diferenciación osteogénico. De esta forma se eliminaron las células que pudieron escapar del scaffold y adherirse a la pared del pocillo.

3. Resultados y discusión

La figura 3.14, muestra las micrografías de SEM de las superficies de los scaffolds de poli(CLMA), sembrados con GBMCs y cultivados en medio osteogénico durante 5 tiempos (3, 7, 14, 21 y 28 días)

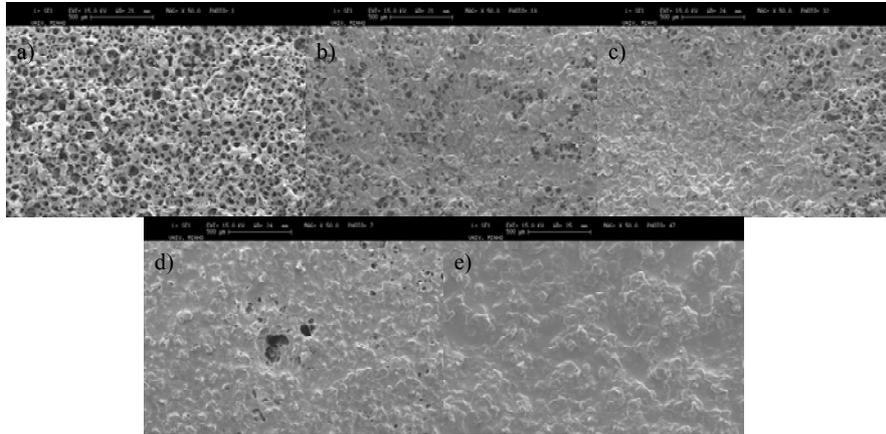


Figura 3.14. Micrografías de SEM de las superficies de los scaffolds de poli(CLMA), sembrados con GBMCs, cultivados en medio osteogénico: día 3 (a), día 7 (b), día 14 (c), día 21 (d) y día 28 día (e). La escala de las imágenes corresponde a 500 μm

Como podemos observar, la densidad celular se incrementa con el tiempo de cultivo, lo cual nos sugiere una adecuada adhesión y proliferación de las células en el soporte poroso. Después de 21 días, la superficie del scaffold esta completamente cubierta por células y matriz extracelular. En la figura 3.15, se ilustra a mayores magnificaciones, cortes transversales de los scaffolds de poli(CLMA) al día 21. En dicha figura se puede observar como las células están adheridas también en el interior del material, esparcidas y con una morfología plana.

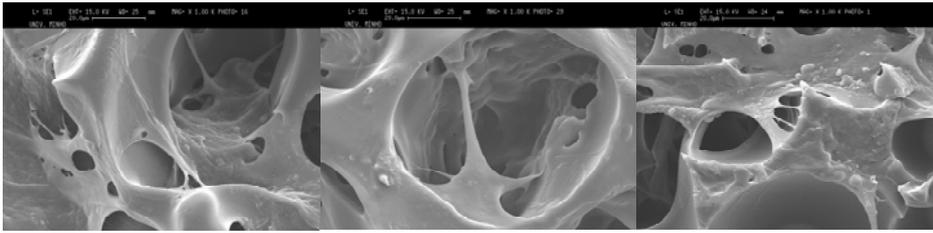


Figura 3.15. Micrografías de SEM de cortes transversales de los scaffolds de poli(CLMA), sembrados con GBMCs y extraídos a los 21 días. La escala de las imágenes corresponde a 20 μm .

Por otro lado, la presencia de una alta densidad celular en el interior de los scaffolds también pudo ser comprobada en los cortes transversales de las muestras empleadas en microscopía confocal, tal y como se describirá más adelante. En consecuencia, podemos concluir que los materiales utilizados presentan una buena biocompatibilidad.

La influencia de la composición química de los materiales sobre los cultivos de GBMCs fue otro de los objetivos a estudiar. En la figura 3.16 podemos observar dicho comportamiento.

3. Resultados y discusión

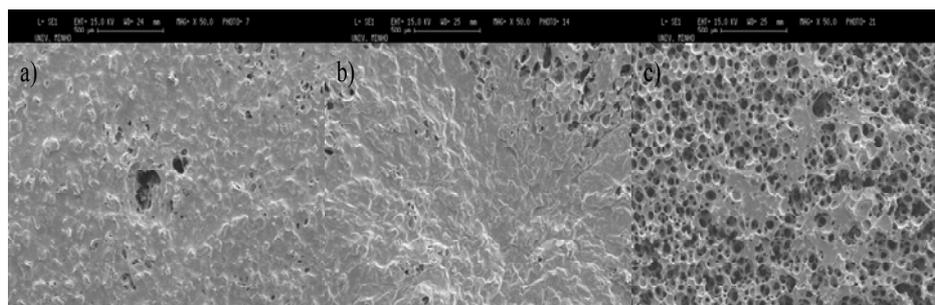


Figura 3.16. Micrografías superficiales de SEM de los scaffolds de poli(CLMA-co-HEA) a los 21 días. a), b) y c) corresponden a poli(CLMA-co-HEA) con relación de (100/0), (70/30) y (50/50) en porcentajes de cada uno de los monómeros respectivamente.

La fracción de superficie que está cubierta por las células y la matriz extracelular disminuye drásticamente en los scaffolds del copolímero poli(CLMA-co-HEA) (50/50) si lo comparamos con las muestras de poli(CLMA). No obstante, el comportamiento de los scaffolds que contienen un 30% de HEA es similar a los scaffolds de los homopolímeros de poli(CLMA). Estos resultados son corroborados en los resultados obtenidos con ensayos de MTS y en la cuantificación de DNA (ver apartado 2.3.1.3).

La figura 3.17 representa los resultados obtenidos en los ensayos de MTS de los scaffolds utilizados con diferentes composiciones, mostrando una ligera disminución de la viabilidad celular después de los 21 días de cultivo en todos los sustratos. Por otro lado, dicha viabilidad celular decrece en todos los tiempos estudiados con el incremento del contenido de HEA en las muestras.

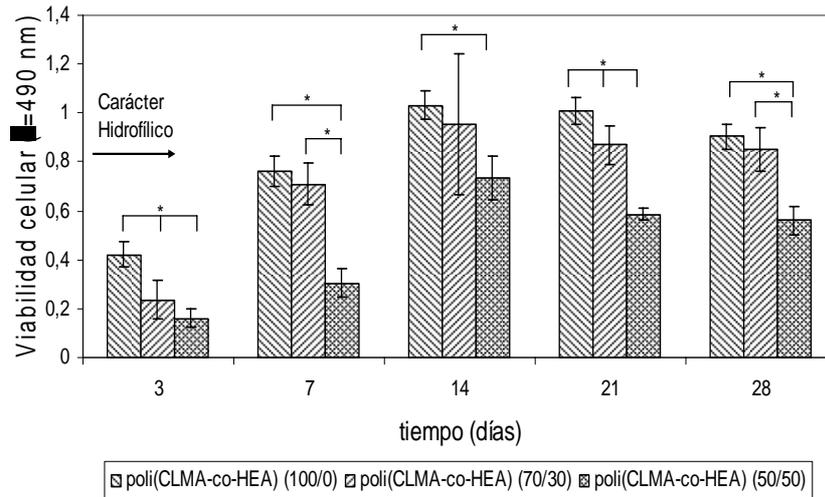


Figura 3.17. Niveles de viabilidad celular tanto para los homopolímeros de poli(CLMA), como para los copolímeros de poli(CLMA-co-HEA), con diferentes composiciones, después de 3, 7, 14, 21 y 28 días de cultivos en medio osteogénico. * $p < 0.05$.

Una vez obtenidos los resultados, realizamos un análisis estadístico de los mismos, utilizando el test de ANOVA, comparando los materiales de diferente composición a pares en un mismo tiempo de cultivo y los resultados concluyeron que existen diferencias significativas entre varios grupos de muestras, siendo las que contienen 100% y 70% de CLMA en algunos de los casos (tiempos 7, 14 y 28), las muestras que presentan resultados similares en cuanto a viabilidad celular ($p < 0.05$).

Otros de los ensayos realizados fue la cuantificación de DNA en todas las muestras estudiadas, el cual nos permitió concluir que existe un incremento significativo en el número de células si comparamos los resultados obtenidos desde el día 3 hasta el día 28 de cultivos (ver figura 3.18), de ahí que podamos

3. Resultados y discusión

concluir que existe en los ensayos realizados una proliferación celular marcada en presencia de medio de diferenciación osteogénico.

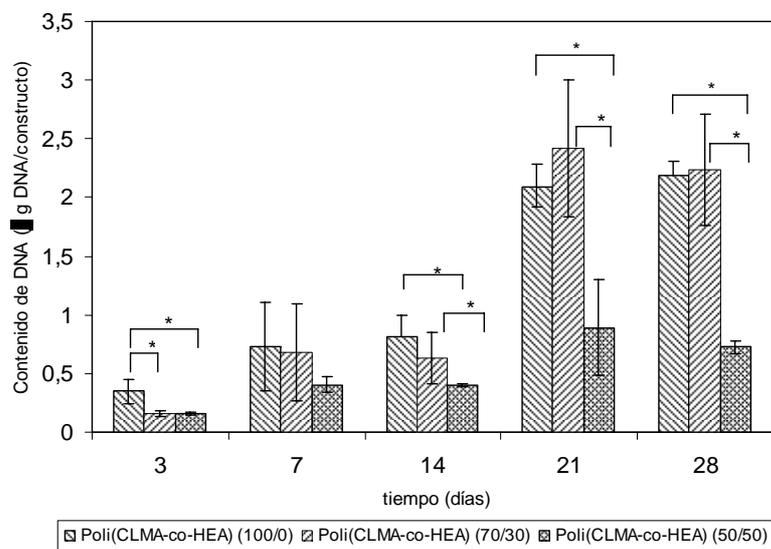


Figura 3.18. Cuantificación de DNA de las GBMCs tanto para los homopolímeros de poli(CLMA), como para los copolímeros de poli(CLMA-co-HEA), con diferentes composiciones, después de 3, 7, 14, 21 y 28 días de cultivos en medio osteogénico. * $p < 0.05$.

Por otro lado, el número de células es más pequeño en los copolímeros con un 50% de HEA con respecto a los scaffolds de poli(CLMA), aunque las diferencias no están claras entre éste último y los scaffolds de poli(CLMA-co-HEA) de composición 70/30, incluso a altos tiempos estas muestras presentan mayor contenido de DNA que los homopolímeros.

Los resultados obtenidos hasta el momento permiten concluir que las GBMCs presentan una excelente adhesión, proliferación y viabilidad en los scaffolds tridimensionales de poli(CLMA) y poli(CLMA-co-HEA) con un 30%

en peso de HEA. La porosidad e interconectividad de las estructuras porosas permite la circulación de nutrientes hacia las células de los cultivos en condiciones estáticas. No obstante, con el incremento del contenido de HEA, aumentan las propiedades hidrófilas en los scaffolds y se reduce el número de células dentro del mismo. Este comportamiento puede ser debido a la falta de adhesión entre las células y el sustrato. Cuando la distribución de los grupos hidrófilos en la superficie del sustrato es homogénea se ha encontrado que la adhesión celular es menor que en materiales de naturaleza hidrófoba y dicha adhesión disminuye monótonamente con el incremento del contenido de grupos hidrófilos en la superficie, lo cual podemos ver en el trabajo, que al aumentar el contenido de HEA en los materiales disminuye la adhesión celular. Además éste comportamiento se ha visto en los cultivos de células de cartílago (condrocitos) en materiales bidimensionales de poli(acrilato de etilo-co-acrilato de 2-hidroxietilo) o sobre materiales de poli(metacrilato de etilo-co-metacrilato de 2-hidroxietilo) [258-262] o cultivo de células humanas provenientes de cordón umbilical sobre copolímeros de poli(acrilato de etilo-co-acrilato de 2-hidroxietilo) [263]. No obstante, las composiciones ideales de estos tipos de sustratos consisten en copolímeros de componentes tanto de características hidrófobas como hidrófilas donde éstas últimas se encuentren entre 0 y 50% [264]

Las diferencias en la adhesión celular con los diferentes sustratos han sido atribuidas justamente a las diferencias en cuanto a absorción se refiere, de diferentes proteínas y su conformación en los materiales. Keselowsky y colaboradores [265] cultivaron osteoblastos de tipo MC3T3-E1 sobre la superficie de diferentes materiales que presentaban una distribución uniforme de diferentes grupos funcionales y los cuales estaban recubiertos por una capa de fibronectina, donde dichos investigadores fueron capaces de correlacionar la

3. Resultados y discusión

adhesión celular y su localización en los sitios donde estaban las secuencias del tripeptido arginina-guanina-ácido aspártico (RGD) de dicha proteína. También se han publicado varios trabajos donde existe una relación entre la influencia de la hidrofiliidad del sustrato y la distribución de los grupos hidrófilos sobre la conformación de las proteínas absorbidas por éstos (sustratos) [266] y todo esto correlacionado con la adhesión celular.

3.1.3.2 Osteoinducción

Como hemos hecho alusión en todo el documento, las GBMCs fueron cultivadas sobre materiales tridimensionales con estructura de poros interconectados, utilizando medio de cultivo osteogénico, por lo que uno de los objetivos era determinar si dichas células presentaban signos de diferenciación. Se realizaron varios ensayos inmunocitoquímicos (ver apartados 2.3.1.3) para detectar la expresión de varios marcadores como son la fosfatasa alcalina (ALP), colágeno tipo I (Col I) y osteocalcina (proteína no-colagínosa) presentes en las células osteoblásticas. Para ello, se realizaron cortes transversales de las muestras cultivadas a los diferentes tiempos y fueron observados al microscopio confocal una vez realizados los ensayos inmunofluorescentes. Las figuras 3.19 a hasta la 3.19 f muestran los diferentes cortes transversales de los scaffolds de poli(CLMA) a los 14 días (a, b, c) y a los 21 días (d, e, f). En todos los casos los núcleos de las células fueron detectados mediante tinción de DAPI (color azul). Como se ha dicho anteriormente, las imágenes de SEM confirman el alto número de células que ha colonizado el interior de los scaffolds. Las muestras de poli(CLMA) presentan marcaciones no-específicas con DAPI por lo que podemos ver su estructura porosa (figura 3.19 a). Las figuras 3.19 a y d

muestran en color rojo la presencia de colágeno tipo I (Col I), el cual es la proteína predominante de la matriz ósea y su expresión y secreción son determinantes en el proceso de mineralización. Una vez que las células han producido Col I, se unen a éste mediante las integrinas, lo cual favorece la proliferación celular [267].

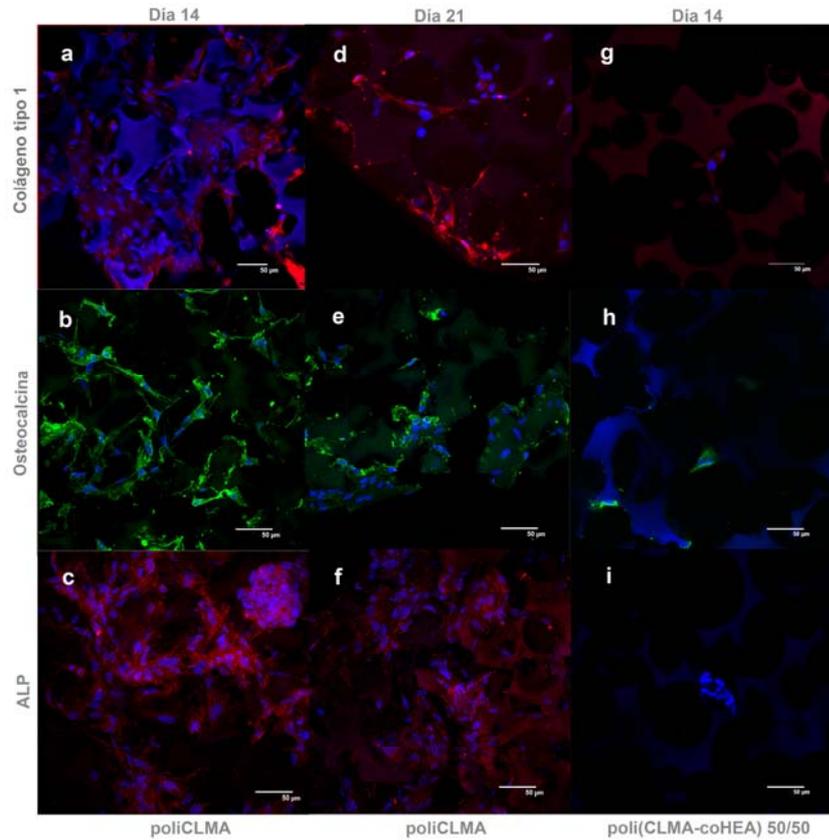


Figura 3.19. Análisis de inmunofluorescencia de marcadores de osteoblastos, en las GBMCs cultivadas en los scaffolds de poli(CLMA). Figuras a y d, correspondientes a colágeno tipo I, osteocalcina (b y e) y ALP (c y f) en los días 14 y 21 de cultivo respectivamente. Las figuras g,

3. Resultados y discusión

h e i corresponden a marcadores de colágeno tipo I, osteocalcina y ALP respectivamente de los scaffolds de poli(CLMA-co-HEA) de composición (50/50).

La ALP es una glicoproteína presente en la superficie de la célula que se detecta en los primeros estadios del proceso de diferenciación y que está involucrada en el proceso de mineralización [268]. En las figuras 3.19 c y f se revela la presencia de ALP (color rojo) en el interior de los scaffolds a los días 14 y 21 de cultivos. Las figuras 3.19 b y 3.19 e muestran la presencia de osteocalcina en la matriz extracelular. La osteocalcina es una matriz proteica que regula la actividad de los osteoclastos [269] y que caracteriza una fase post proliferativa, por lo que de las figuras 3.19 b y e se puede interpretar que el proceso de diferenciación osteogénica no es completo a los 21 días. Estos resultados confirman que las GBMCs cultivadas en nuestros materiales están en el paso de proliferación y diferenciación donde algunas células son osteoprogenitoras y otras son pre-osteoblastos [269].

Las figuras 3.19 g, h e i, se muestran las imágenes de los ensayos de inmunofluorescencia de los cortes transversales realizados a los scaffolds de poli(CLMA-co-HEA) de composición 50/50. Como ya se ha comprobado en las determinaciones de MTS y DNA, el número de células dentro del scaffolds es claramente inferior que en los scaffolds de poli(CLMA), aunque éstas expresan colágeno tipo I y osteocalcina, no siendo así en el caso del ALP donde los resultados son negativos.

3.2 Síntesis de redes de copolímeros de poli(mCL-co-HEA)

En el apartado anterior hemos abordado el estudio de copolimerización de CLMA con HEA, que nos ha permitido obtener muestras de naturaleza acrílica, pero con unidades de ϵ -caprolactona laterales, o sea, que no forman parte de la red principal del material. Es por ello que hemos decidido seguir el trabajo hacia la obtención de un material donde las cadenas de policaprolactona formen parte de la estructura principal del polímero y sin perder las características hasta ahora logradas, el hecho de poder entrecruzar y copolimerizar unidades de ϵ -caprolactona con monómeros de naturaleza acrílica e hidrófila con el objetivo de poder controlar la hidrofiliidad del sistema. Para abordar esta idea seguimos el procedimiento descrito en el epígrafe 2.3.2, donde se describe la reacción entre la PCL diol con grupos hidroxilos α y ω terminales y el anhídrido metacrílico, mediante una reacción de esterificación y de esta forma obtener un macrómero (mCL) (ver figura 3.20) con unidades de ϵ -caprolactona en la cadena principal y con grupos metacrilatos terminales.

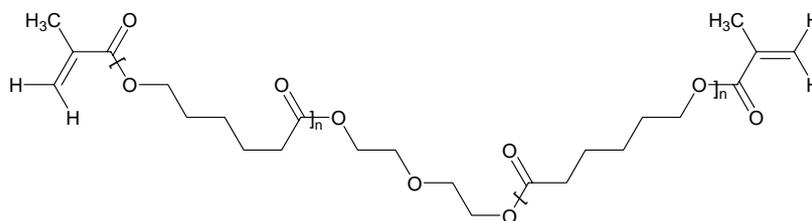


Figura 3.20. Estructura química de mCL

Se caracterizó el PCL diol y el mCL mediante FTIR-ATR y se muestran a continuación los espectro.

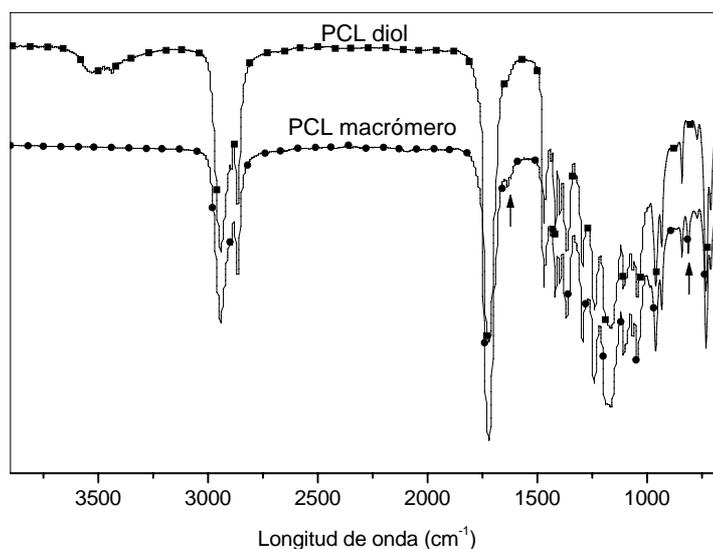


Figura 3.21. Espectro de FTIR-ATR de la PCL diol y mCL obtenidos mediante el proceso de síntesis que se describe en la figura 2.1

La banda que se observa alrededor de los 3600 a 3000 cm^{-1} en el caso de la PCL diol se debe a la vibración de valencia de los grupos OH terminales del material, la cual no se observa en el caso de la mCL, debido a la desaparición de dichos grupos funcionales producto a la reacción de esterificación entre la PCL diol y el anhídrido metacrílico. Otras modificaciones importantes en el espectro se observan a los 1640 y 812 cm^{-1} , debido a las vibraciones C=C, debido a la acrilación provocada en la PCL diol (ver flechas en la figura 3.21). Dichas modificaciones no se observan en el material de partida. Otras bandas significativas se localizan en los 1720 cm^{-1} debido a las vibraciones del grupo

carbonilo C=O y las localizadas aproximadamente entre los 2950-2860 cm⁻¹ debido a las vibraciones de valencia simétricas y antisimétricas de los CH₃ y CH₂ presentes tanto en la PCL diol como en el mCL.

La reacción de esterificación también fue comprobada por Resonancia Magnética Nuclear de protones ¹H-RMN. Los espectros de la PCL diol y mCL se ilustran a continuación:

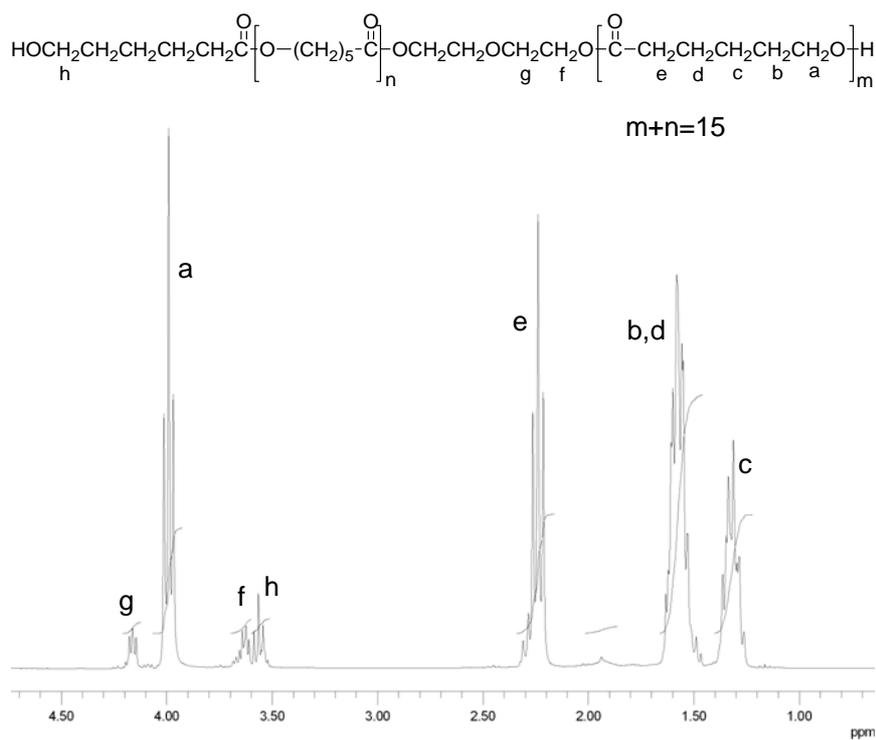


Figura 3.22. Espectro de ¹H-RMN de la PCL diol obtenido a 500 MHz, en CDCl₃.

3. Resultados y discusión

Como se puede observar en la figura 3.22, aparecen una serie de bandas en la región de 1 a 4.2 ppm y que son debido a los H-Csp³ de la cadena carbonada de la PCL diol y un pico situado en 2 ppm aproximadamente debido a los protones terminales de OH de la molécula. Las asignaciones de todos los picos están reflejadas en la misma figura tanto en el espectro como en la estructura. En el espectro de la mCL, figura 3.23, además de los picos que aparecen en el espectro de la PCL diol en la figura anterior se observan dos picos dobletes situados en 6.05 y 5.51 ppm debido a la incorporación del grupo vinilo en la estructura CH₂ (j y k) y el singlete en 1.94 ppm proveniente del CH₃ (i) del grupo metacrilato.

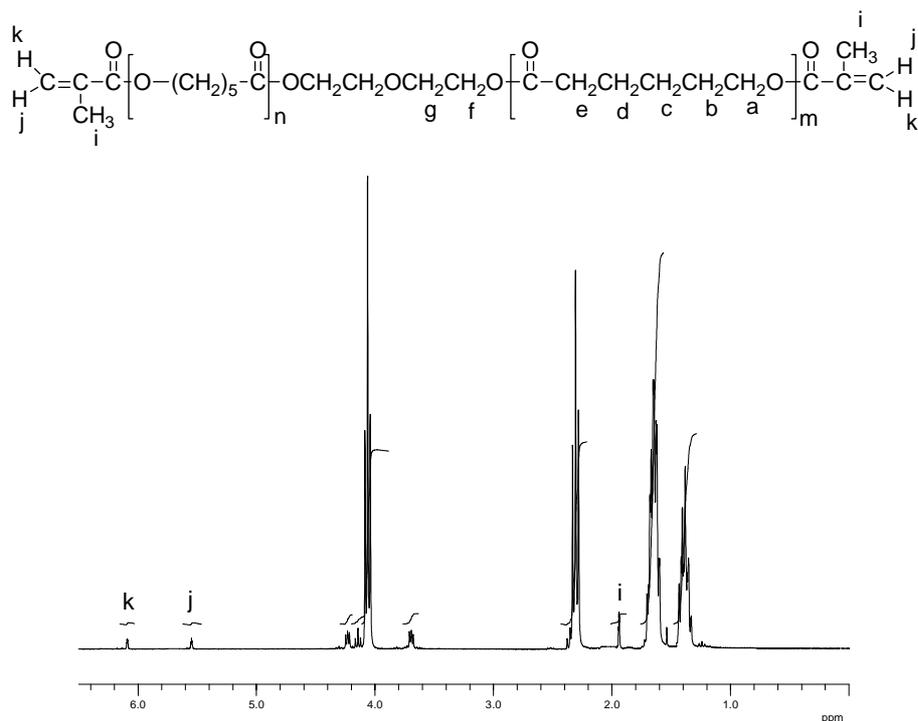


Figura 3.23. Espectro de ¹H-RMN del macrómero mCL obtenido a 500 MHz, en CDCl₃.

El grado de funcionalización (FD) fue estimado a partir del espectro que se observa en la figura 3.23, relacionando la intensidad de la señal CH_2 (g) que corresponde a la parte de la estructura proveniente de la PCL diol con una de las señales vinílicas, en este caso CH_2 (j), producto de la modificación realizada a la misma. El FD medido fue de aproximadamente el 80%. La incorporación efectiva de los grupos metacrilatos hizo posible la foto polimerización y en este caso su entrecruzamiento debido a su condición de macrómero tetrafuncional del sistema.

Una vez caracterizados tanto el material de partida (PCL diol) como el macrómero (mCL) mediante FTIR-ATR y ^1H -RMN, seguimos el procedimiento descrito en los apartados 2.3.2.2 y 2.3.2.3 en los que se describe las reacciones de homopolimerización del mCL y las reacciones de copolimerización del mCL con HEA.

Los espectros de FTIR-ATR del homopolímero de mCL y de sus copolímeros con HEA se ilustran en el gráfico 3.24.

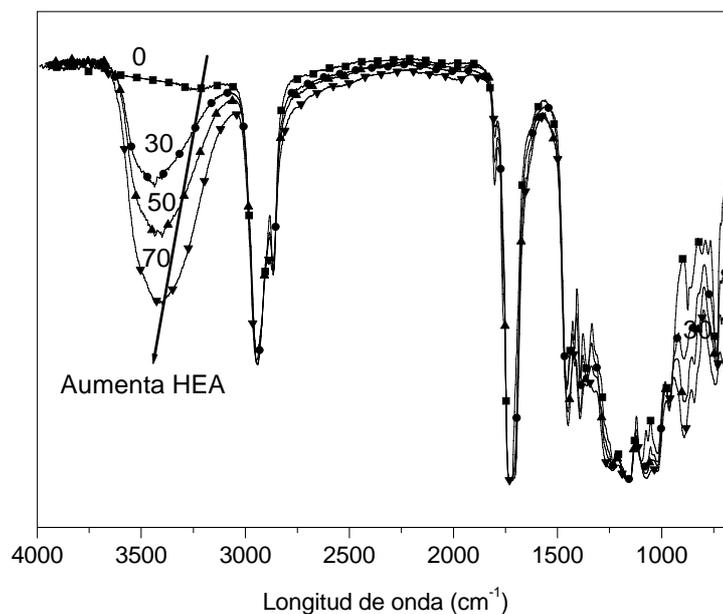


Figura 3.24. Espectro de FTIR-ATR de las redes de copoliméricas. El número en cada curva muestra el wt% de HEA.

La banda situada entre los 3500-3200 cm⁻¹ es debida a la vibración de valencia de los C-O-H provenientes de la copolimerización del mCL con HEA, es de destacar que esta banda se incrementa con el contenido de HEA en las muestras. Además podemos también destacar del espectro la banda localizada en los 1723cm⁻¹, correspondiente a vibración del grupo carbonilo (C=O) de los ésteres formados y las bandas localizadas aproximadamente en los 2950-2860 cm⁻¹, éstas debido a las vibraciones de valencia simétricas y antisimétricas de los CH₃ y CH₂ presentes en las redes copoliméricas.

La figura 3.25 ilustra los termogramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) del mCL, redes de homopolímero de mCL y los copolímeros de poli(mCL-co-HEA).

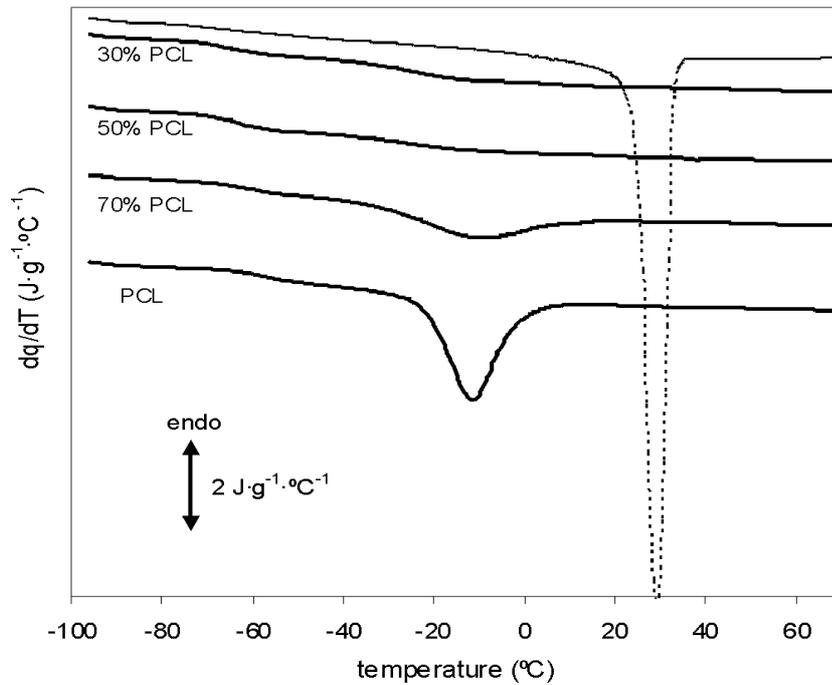


Figura 3.25. Curvas de DSC en enfriamiento a $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. La línea de puntos en el gráfico corresponde al barrido del mCL.

La figura anterior muestra las curvas de enfriamiento a $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde el estado de fundido, una vez borrada la historia térmica al material, llevándolo a 60°C y manteniéndolo a esa temperatura durante 5 min. La exoterma para el

3. Resultados y discusión

mCL es la curva representada con línea discontinua con un máximo en aproximadamente 30°C. Esta situación cambia para las redes, empezando por las de poli(mCL) donde se observa un pico exotérmico ancho de cristalización localizado a más bajas temperaturas (aproximadamente -10°C). Dicho proceso de cristalización tiende a desaparecer a medida que se incrementa la cantidad de HEA en las redes copoliméricas (los valores de la entalpía de cristalización se muestran en la tabla 3.3).

Tabla 3.3. Valores de los calores de cristalización y fusión medidos en los barridos de DSC realizados a las redes del mCL con HEA. ($n_{\text{HEA}}/n_{\text{mCL}}$, número de moles de HEA por unidad de mCL en la red; ΔH_m entalpía de fusión por unidad de masa de mCL en el sistema; ΔH_c entalpía de cristalización en enfriamiento por unidad de masa de mCL; $\Delta H_c^{\text{calentamiento}}$ entalpía de cristalización durante el barrido de calentamiento por unidad de masa de mCL)

ω_{HEA}	$n_{\text{HEA}}/n_{\text{p(mCL)}}$	$\Delta H_m(\text{J}/\text{g}_{\text{p(mCL)}})$	$\Delta H_c(\text{J}/\text{g}_{\text{p(mCL)}})$	$\Delta H_c^{\text{calentando}}(\text{J}/\text{g}_{\text{p(mCL)}})$
0	0	37.9	37.5	--
0.3	14	39.8	27.9	12.4
0.5	34	35.2	---	29.6
0.7	78	22.3	---	14.7

La figura 3.26 muestra los barridos de calentamiento de DSC medidos en las redes de diferente composición. El termograma muestra primeramente la transición vítrea de las unidades de caprolactona con una temperatura de transición vítrea (T_g) aproximadamente en -60°C, seguido del pico exotérmico

de cristalización en calentamiento especialmente claro en los copolímeros que contienen 50 y 70% de p(mCL). La transición vítrea de los dominios de HEA presentes en las muestras no está claramente identificada debido a la superposición de este proceso con la fusión del p(mCL) que tiene lugar entre 10 y 50°C. El máximo del pico endotérmico de fusión aparece en los copolímeros alrededor de 10 grados por debajo del de la p(mCL). Los valores de las entalpías de fusión y de cristalización en el proceso de calentamiento se han incluido en la tabla 3.3.

La manera en que las unidades de HEA están presentes en la red, formando bloques que unen los extremos de cadenas de p(mCL), como se ve en la figura 3.26, hace intuir la posibilidad de que se produzca una separación de fases. En los termogramas de DSC la mezcla homogénea de segmentos de HEA y de mCL se traduciría en un desplazamiento de la transición vítrea hacia temperaturas intermedias entre las del PHEA y el p(mCL), en nuestro caso un desplazamiento de la T_g en las redes copoliméricas hacia altas temperaturas respecto de la del p(mCL). La transición vítrea de las redes de p(mCL) tiene lugar a mayores temperaturas que el mCL (ver figura 3.26). No obstante, al aumentar la cantidad de HEA, la región de la transición vítrea de los dominios de p(mCL) en las redes copoliméricas ocurren en el mismo rango de temperaturas, lo que abunda en el hecho de que los segmentos de p(mCL) se agrupan en regiones de suficiente tamaño como para sufrir reordenamientos que no se ven afectados por la presencia de grupos de HEA.

3. Resultados y discusión

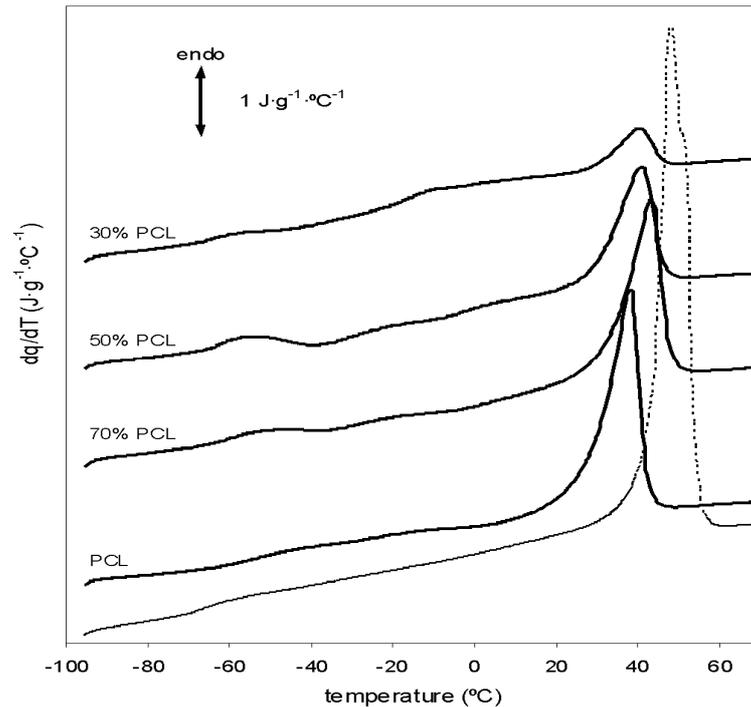


Figura 3.26. Curvas de DSC en calentamiento a 10°C/min. La línea de puntos en el gráfico corresponde al tratamiento de la mCL.

La entalpía de fusión (por gramo de p(mCL) en la red) se reporta en la tabla 3.3. Hasta un 50 % wt. de HEA en el copolímero, la entalpía de fusión de las unidades de p(mCL) no muestran cambios considerables comparado con las redes de p(mCL). No obstante, para altos contenidos de HEA la entalpía de fusión se reduce significativamente. El proceso de copolimerización ejerce un mayor efecto sobre el proceso de cristalización en enfriamiento. Para un contenido de HEA en el sistema mayor de un 50% wt la cristalización de las

cadena de p(mCL) se ve impedida, además de que la cinética de cristalización se modifica por la hidrofiliación del p(mCL) con unidades de HEA.

En las redes de p(mCL), no se observa proceso de cristalización durante el barrido de calentamiento y la entalpía de cristalización en el enfriamiento es igual a la entalpía de fusión en el proceso posterior de calentamiento (ver tabla 3.3). Para las muestras con un contenido de HEA de un 30% wt., los segmentos de p(mCL) no son capaces de cristalizar completamente en el proceso de enfriamiento antes de llegar a la región de la T_g , pero muchos núcleos de cristales se forman los cuales permiten la cristalización en el proceso de calentamiento posterior. En dicha muestra (30% wt. HEA), la entalpía de fusión es igual a la suma de la entalpía de cristalización en el proceso de enfriamiento y en el proceso de calentamiento.

La situación descrita anteriormente es ligeramente diferente para contenidos mayores de HEA en el sistema. La cristalización en enfriamiento desaparece y además la entalpía de fusión es mayor que la de cristalización en el proceso de calentamiento, lo que sugiere que existen procesos de reordenamiento de los cristales en el calentamiento lo que contribuye al pico total exotérmico [262].

La figura 3.27 muestra el módulo de almacenamiento y la tangente de pérdida de las redes, obtenida mediante ensayos dinámico-mecánicos.

3. Resultados y discusión

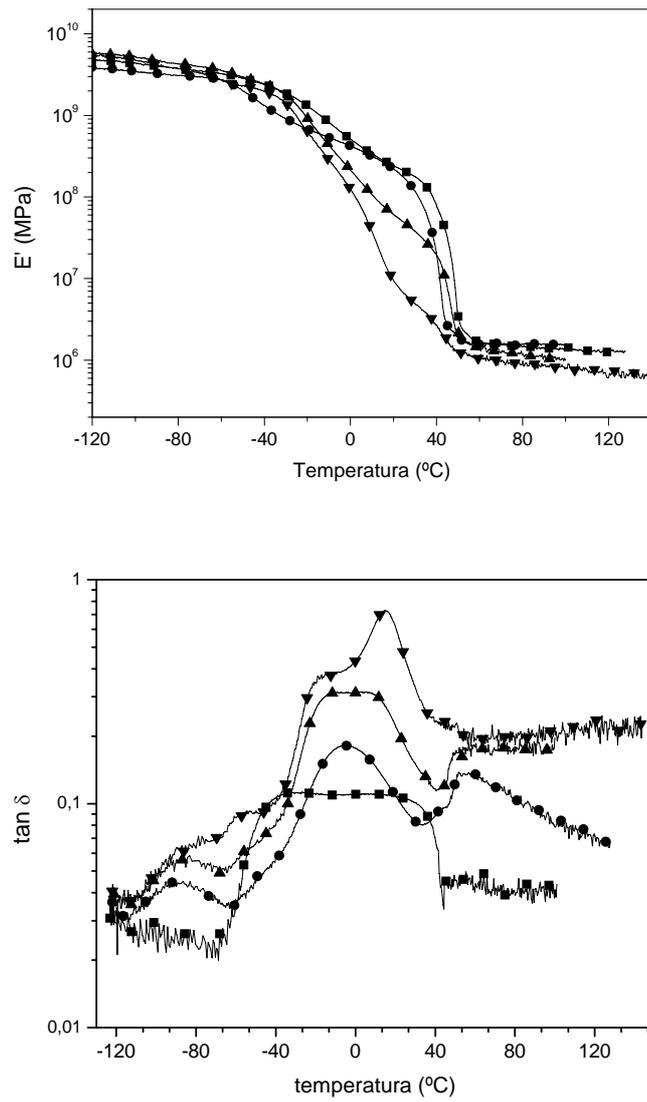


Figura 3.27. Módulo de almacenamiento (arriba) y tangente de pérdida (abajo) en calentamiento de las redes copoliméricas, (■) 100% p(mCL), (●) 70% p(mCL), (▲) 50% p(mCL), (▼) 30% p(mCL).

A bajas temperaturas, todas las muestras presentaron un valor alto del módulo de almacenamiento, aproximadamente $4 \cdot 10^9$ Pa a -80 °C, característico de los polímeros vítreos o semicristalinos con fases amorfas y cristalinas. El módulo de goma de la red de p(mCL) es la típica de un elastómero (aprox. 10^6 Pa) y disminuye a medida que aumenta el contenido de HEA en las redes copoliméricas. La figura 3.27 se ilustra una relajación amplia en un rango de temperaturas de entre -40 °C y 40 °C para las redes de PCL, la cual tiende a dividirse en dos a medida que se incrementa el contenido de HEA en las muestras. Además, E' cae desde el estado vítreo hasta el estado de goma, con una marcada caída a temperaturas más altas como consecuencia del proceso de fusión de las unidades de p(mCL). Al incrementarse el contenido de HEA en el sistema, el módulo después de la relajación principal disminuye y esto es debido a la baja cristalinidad y consecuentemente la caída como consecuencia de la fusión de estas muestras es menos marcada. Además cuando se incrementa el contenido de HEA en las muestras, el pico γ (aprox. -100 °C) característico de movimientos locales de los grupos funcionales que presentan las cadenas laterales en el HEA se incrementan.

Como hemos visto, el módulo de goma presenta una dependencia monótona con el contenido de HEA en el sistema, que además puede ser explicada por el incremento de la flexibilidad de la red debido a la incorporación de las unidades de HEA entre las cadenas de p(mCL). Mediante cálculos estequiométricos podemos brindar un estimado de la proporción de las unidades de HEA respecto al número de unidades de mCL.

$$\frac{n_{HEA}}{n_{PCL}} = \frac{\omega_{HEA}}{1 - \omega_{HEA}} \cdot \frac{M_{PCL}}{M_{HEA}} \quad (11)$$

3. Resultados y discusión

donde n es el número de moles, ω_{HEA} es la fracción en masa de HEA en el sistema y M es la masa molecular. En la tabla 3.4 se reportan los valores calculados para los diferentes copolímeros usando la ecuación 11. La manera en la cual las unidades de HEA están dispuestas en la red puede determinar tanto la arquitectura de las redes copoliméricas como sus propiedades.

Tabla 3.4. Parámetros de la red. M_{PHEA} es la masa molar estequiométrica de PHEA entre nudos de entrecruzamiento, M es la masa molar promedio entre nudos de entrecruzamiento; E' módulo de almacenamiento medido a 100°C; M_c ; masa molar promedio entre nudos de entrecruzamiento medido a partir de la teoría de elasticidad del caucho (*phantom theory*).

ω_{HEA}	$n_{HEA}/n_{p(mCL)}$	M_{PHEA}	M	E' (MPa)	M_c
0	0	--	--	1.59	2140
0.3	14	836	1857	1.30	2699
0.5	34	1950	2600	1.09	3300
0.7	78	4550	4333	8.62	4255

Las redes de p(mCL) son formadas a partir del macrómero tetrafuncional, son redes semicristalinas y tienen una alta densidad de entrecruzamiento. A todas estas propiedades, se le unen en los copolímeros a la adición de unidades más flexibles provenientes del HEA (116g/mol) en las proporciones mostradas en la tabla 3.4. La topología de las redes copoliméricas resultantes pueden ser pensadas como la estructura descrita en la figura 3.28,

con un número de unidades monoméricas de HEA, a , de acuerdo con los valores estequiométricos calculados y que se reportan en la tabla 3.4.

La estructura ideal de la figura 3.28, se corresponde con el cálculo de la masa molecular promedio entre nudos de entrecruzamiento calculada a partir de la siguiente expresión:

$$M_{PHEA} = 2 \frac{n_{HEA}}{n_{PCL}} M_{HEA};$$

donde la masa molecular promedio de la red se calcula

de acuerdo con la estructura de la figura 3.28, teniendo en cuenta la funcionalidad de las uniones ideales:

$$M = \frac{2}{3} M_{PHEA} + \frac{1}{3} M_{PCL}. \quad (12)$$

En la tabla 3.4 se reportan los valores calculados a partir de la ecuación 12.

$$E' = 3A_\phi \frac{n_c}{V} RT = 3A_\phi \frac{d}{M_c} RT \quad (13)$$

donde R es la constante universal de los gases, d es la densidad, T es la temperatura absoluta, E' es el módulo en la región elastomérica a T , M_c es la masa molecular promedio entre nudos de entrecruzamiento y A_ϕ es un factor que depende de cuanto las deformaciones se desvía del límite afín, en el cual los desplazamientos de los entrecruzamientos son funciones simples lineares de la deformación macroscópica. En el caso de la deformación no afín de las redes, la teoría “Fantasma” indica que:

$$A_\phi = 1 - \frac{2}{\phi} \quad (14)$$

donde ϕ representa la multiplicidad de los nudos en la red polimérica [264]. Hemos considerado $\phi=3$ en nuestro caso (figura 3.28) y M_c puede ser calculado a partir del valor experimental de E' en la región de goma. Los resultados se reportan en la tabla 3.4. La masa molar entre nudos de entrecruzamiento de la red de mCL concuerda con el peso molecular de la policaprolactona diol usada como material de partida en la síntesis de las redes ($M \sim 2000$ Da).

A partir de las predicciones de la ecuación 12, y comparando los resultados de la masa molecular con los resultados obtenidos experimentalmente, podemos decir que el modelo ideal propuesto y que se representa en la figura 3.28 es razonable para las redes preparadas en este trabajo.

3. Resultados y discusión

La figura 3.29 representa el volumen específico de las redes copoliméricas calculado a partir de las medidas de densidades. Se encontró una dependencia lineal monótona con el contenido de HEA en las muestras.

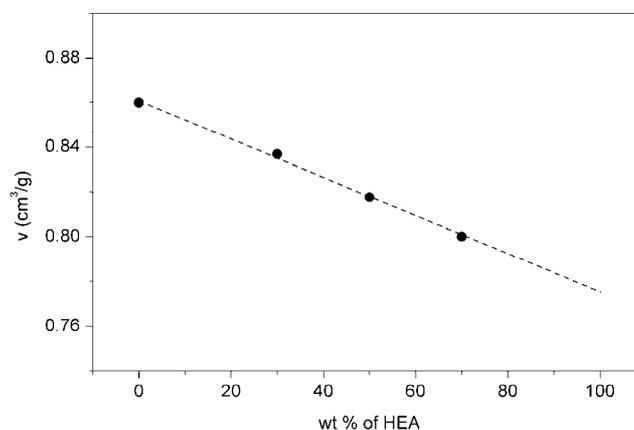


Figura 3.29. Volumen específico de las redes copoliméricas en función de la masa de HEA en los sistemas.

El volumen específico de las redes de copolímeros disminuye en una tendencia lineal con el aumento del contenido de HEA en las muestras preparadas (el volumen específico de la red de PHEA entrecruzada con 1% wt. EGDMA es menor que la red de PCL, aprox. 0.77 g/cm^3). Este resultado sugiere que la habilidad de empaquetamiento de las cadenas está cerca de ser una superposición lineal de ambos componentes.

Como hemos podido comprobar, ni las medidas de DMTA, ni las de DSC han podido elucidar claramente la microestructura del sistema en cuanto a las transiciones y movimientos de las cadenas de HEA presentes en las muestras. La espectroscopia de dieléctricas (DRS) muestra la existencia de dos

relajaciones α en el sistema. Las figuras 3.30 y 3.31, representan los espectros de las relajaciones dieléctricas de las redes de copolímeros a 1 Hz y 2.5 MHz. La relajación α de las unidades de caprolactona tienen lugar a -40°C para todos los copolímeros, sin embargo la intensidad del pico de ϵ'' decrece con el incremento de la cantidad de HEA en las redes (ver figura 3.31). La relajación α de las unidades de HEA tiene lugar aproximadamente a 40°C y se mueve a más altas temperaturas con el contenido de HEA en los sistemas (ver figura 3.32).

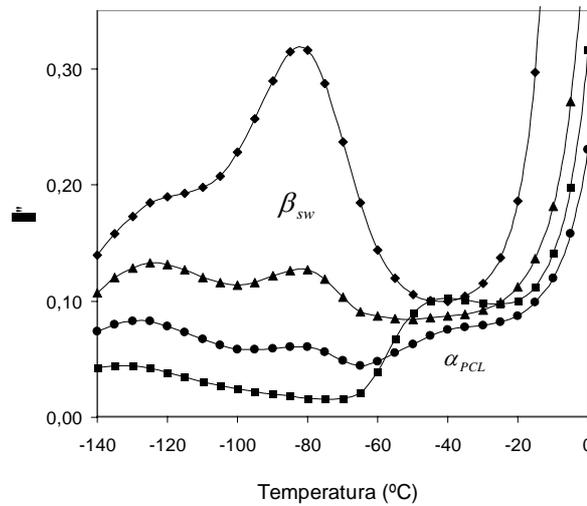


Figura 3.30. Permitividad dieléctrica de las muestras a 1Hz para las redes copoliméricas con la temperatura. (■) 100% p(mCL), (●) 70% p(mCL), (▲) 50% p(mCL), (◆) 30% p(mCL).

3. Resultados y discusión

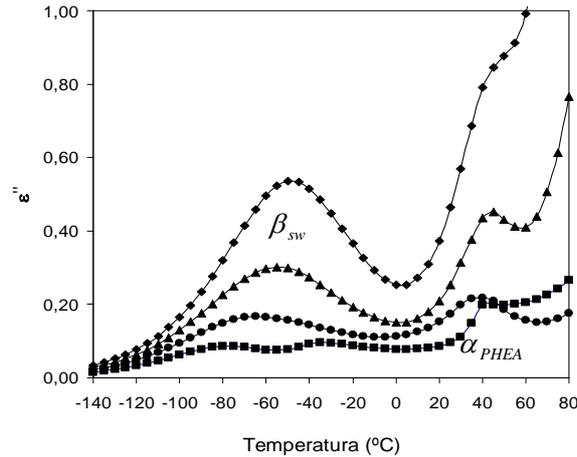


Figura 3.31. Permitividad dieléctrica de las muestras a 2.5 MHz para las redes copoliméricas con la temperatura. (■) 100% p(mCL), (●) 70% p(mCL), (▲) 50% p(mCL), (◆) 30% p(mCL).

El final de la transición alfa está parcialmente solapado con el comienzo del proceso de fusión de las cadenas de p(mCL). El pico de aproximadamente -80°C (1 Hz, figura 3.30) y (2.5 MHz, figura 3.31), que depende fuertemente de la cantidad de agua en el sistema, está asociada a la llamada β_{sw} [265], debido a la asociación de las moléculas de agua con los grupos hidroxilos de la cadena lateral. Su intensidad se incrementa con el incremento de HEA en los copolímeros. La relajación γ de las unidades de HEA pueden ser observadas a la misma temperatura (aprox. -120°C) para todos los copolímeros. La dependencia de la temperatura con la relajación principal de las unidades hidrófilas se aborda claramente en la figura 3.32. Los resultados de los ensayos dinámico-mecánicos permitieron ver la relajación principal de los bloques de p(mCL), las medidas dieléctricas permiten ver la relajación debida a los reordenamientos conformacionales de las cadenas de HEA dentro de sus

agregados. Es interesante observar la fuerte dependencia de la temperatura a la que se produce la relajación principal de los bloques de HEA con el contenido de HEA del copolímero, o lo que es lo mismo con la longitud de las cadenas de HEA entre puntos de entrecruzamiento. Cuando ésta es pequeña, la relajación principal se produce a temperaturas más altas como consecuencia del mayor impedimento a los reordenamientos de éstas cadenas producidos por el anclaje en sus extremos. Por otra parte, la cristalización de las cadenas de p(mCL), que suponen un mayor impedimento a la movilidad de las cadenas de HEA también es creciente al disminuir el contenido de HEA en el copolímero.

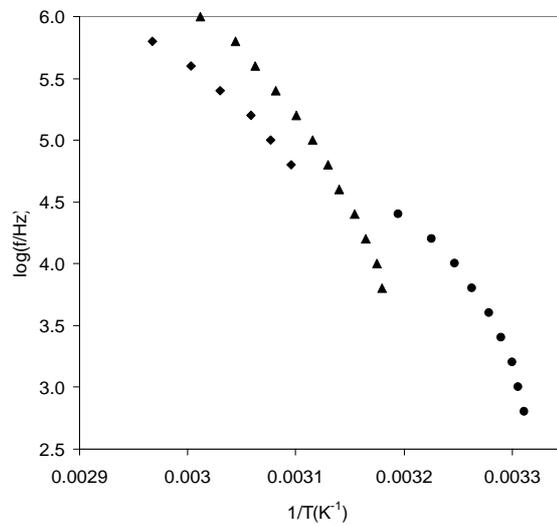


Figura 3.32. Frecuencia del máximo de la tangente de pérdida dieléctrica vs. el inverso de la temperatura para las redes copoliméricas. (●) 70% p(mCL), (▲) 50% p(mCL), (▼) 30% p(mCL).

El análisis termogravimétrico (TGA) puede ser observado en las figuras 3.33 y 3.34.

3. Resultados y discusión

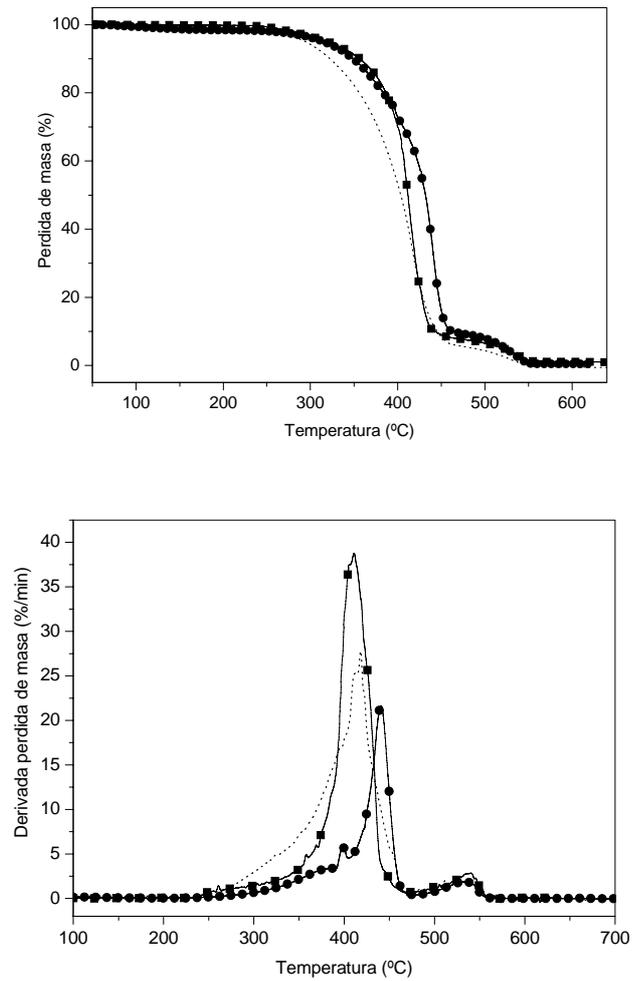


Figura 3.33. Termogravimetría de los homopolímeros de p(mCL) y PHEA. Perdida de masa vs. temperatura (arriba), derivada de la pérdida de masa vs. temperatura (abajo) para (■)p(mCL) y (●) PHEA. Las líneas discontinuas representan el proceso de degradación del mCL

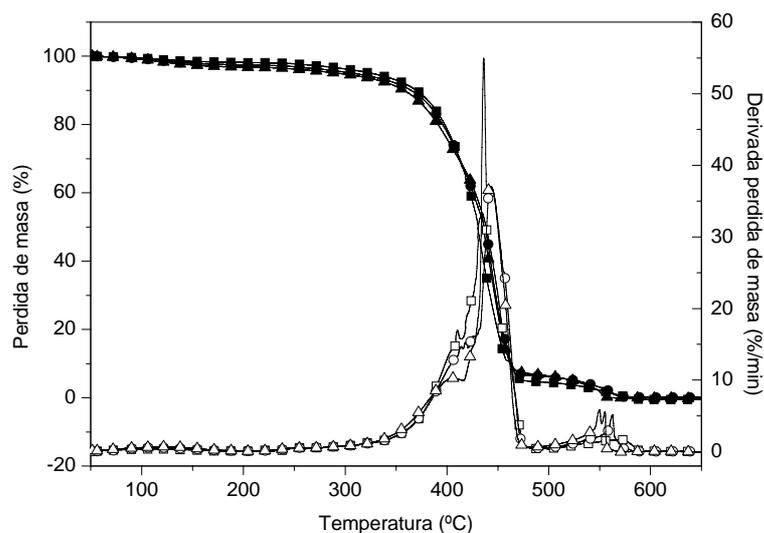


Figura 3.34. Termogravimetría de los copolímeros. Pérdida de masa (símbolos rellenos) y la derivada de la pérdida de masa (símbolos abiertos) con la temperatura. (■) 70% p(mCL), (●) 50% p(mCL), (▲) 30% p(mCL).

Estas curvas no solo reflejan el proceso degradación química del material sino también la pérdida de volátiles tales como el monómero residual que haya quedado en el polímero final, reflejándose en el gráfico con una pérdida de masa por debajo de los 220°C. Es de destacar que dicha pérdida de masa no se ha detectado tanto en los homopolímeros como en los copolímeros. La degradación térmica de la red de p(mCL) empieza aproximadamente en 280°C y se completa en los 560°C y lo mismo pasa en los copolímeros. Para el PHEA el intervalo es entre 280°C y 550°C. El rango de la pérdida de masa se aprecia mejor en el gráfico de la derivada de pérdida de masa. En este caso usamos los

3. Resultados y discusión

máximos de las curvas para caracterizar los diferentes estados en el proceso de degradación. Así, la pérdida de masa de la red de p(mCL) se produce en dos pasos, los cuales llamaremos $\lambda_1(405\text{ °C})$ y $\lambda_2(545\text{ °C})$, para las redes de PHEA el proceso de degradación se resuelve en tres etapas que llamaremos $\chi_1(390\text{°C})$, $\chi_2(450\text{°C})$ y $\chi_3(535\text{°C})$. Por otro lado en el caso de los copolímeros podemos identificar tres etapas, $\xi_1(545\text{ °C})$, $\xi_2(390\text{ °C})$ y $\xi_3(T_x)$, en la cual T_x (localizada entre 405 y 450°C) depende ligeramente de la cantidad x de HEA en las muestras.

La figura 3.35 muestra la ganancia de peso de las muestras después de sumergidas en agua destilada durante 3 días. La capacidad de absorción de agua w fue medida como la relación entre masa de agua absorbida por unidad de masa del polímero seco (xerogel) después del proceso de inmersión:

$$w = \frac{m_{water}}{m_{xerogel}} \quad (15)$$

La copolimerización con HEA incrementa la capacidad de absorción de agua en las muestras desde un 0.19 en la red de p(mCL) a 1.18 en el copolímero con un 70% wt. de HEA. La cantidad de agua absorbida por unidad de HEA en el sistema, w' , puede ser calculada a partir de la siguiente ecuación:

$$w' = \frac{w - w_{p(mCL)}(1 - \omega_{HEA})}{\omega_{HEA}}, \quad (16)$$

Donde $w_{p(mCL)}$ es la capacidad de absorción de agua de la p(mCL).

La cantidad de agua absorbida por unidad de HEA es mucho menor en las redes de copolímero con bajo contenido de HEA (hasta un 50% wt.) que en

las redes de PHEA, no obstante se ha obtenido mas o menos el mismo valor para los copolímeros con mayor contenido de HEA (70% wt.).

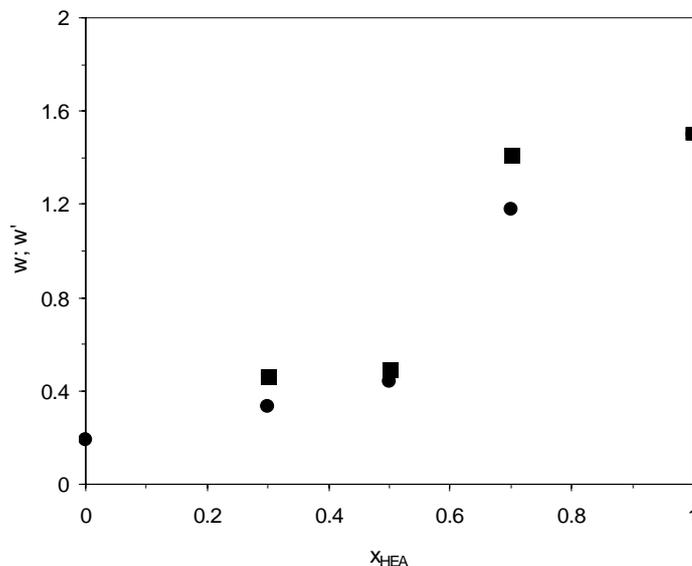


Figura 3.35. Contenido de agua en el equilibrio (w , ●) por unidad de masa de las muestras y por unidad de HEA en los copolímeros (w' , ■), calculada a partir de las ecuaciones 15 y 16 del documento.

Este comportamiento concuerda con los resultados de DRS y puede ser explicado por el número de unidades de HEA por unidad de p(mCL) en las redes copoliméricas. Cuando el copolímero contiene un 50% wt. de HEA, hay 34 unidades de HEA por unidad de macrómero en la red. Para un 70% wt de HEA hay 78 unidades de HEA por cadena de p(mCL). Esto sugiere que se necesitan un mínimo número de unidades de HEA para obtener una microfase de naturaleza hidrófila que se comporte como una red de homopolímero de PHEA.

3.2.1 Arquitectura de los scaffolds de poli(mCL)

Como se ha descrito en el epígrafe 2.3.2.4, los scaffolds fueron obtenidos utilizando la mezcla monomérica descrita e inyectándola sobre una plantilla o template, siendo éste posteriormente disuelto y obtenido el material poroso.

La figura 3.36 ilustra las micrografías de SEM obtenidas de los scaffolds realizados, donde se puede observar las estructuras tridimensionales de poros interconectados.

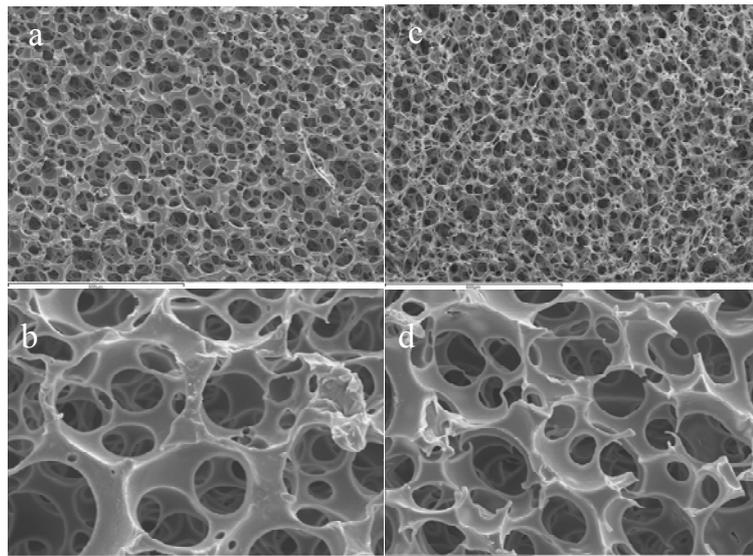


Figura 3.36. Micrografías de SEM de scaffolds de homopolímero de p(mCL). Imagen superficial (a) y magnificación 500x (b), imagen corte transversal (c) y magnificación 500x (d)

Como podemos observar, se obtienen scaffolds de estructura porosa con una alta interconexión y con un tamaño de poro de alrededor de 90 μm (tamaño promedio de las partículas esférica del template). A diferencia de las

fotos de la figura 3.9, se ve como las paredes o gargantas de estos scaffolds son más finas y la estructura a simple vista parece más porosa y esto es debido a que en el proceso de fabricación hemos utilizado en este caso un molde de bolas de PMMA (como se ha descrito en el apartado 2.3.1.2 para las redes de CLMA, pero en este caso para los homopolímeros de p(mCL)) o template el cual se ha comprimido en un 25% (dejando aun menos espacio entre las bolas y por consiguiente obteniéndose las paredes del scaffolds mas finas) no siendo así en la figura 3.9 donde se ha utilizado un template del 23%, siendo el proceso de sinterizado el factor determinante en la obtención del scaffolds final [249]. Además es de destacar que la concentración utilizada de macrómero para preparar los scaffolds fue del 0.33 mol/L, mayor que en el caso de la preparación de los scaffolds de p(CLMA) (0.16 mol/L), debido que al preparar la disolución de mCL y ocluir la en la plantilla, hubiera suficiente cantidad de macrómero para formar la red de polímero entre los intersticios de las bolas de PMMA utilizadas

3.3 Síntesis de redes de L-láctido con hidrofiliidad controlada

En el epígrafe anterior hemos descrito una vía de síntesis, donde modificando la estructura química de la ϵ -caprolactona hemos podido obtener redes entrecruzadas de la misma que pueden ser utilizadas en ingeniería de tejidos, confiriéndole al material una variación en sus propiedades mecánicas y propiedades hidrófilas al poder copolimerizar el nuevo monómero con otros de

3. Resultados y discusión

ésta naturaleza. En esta fase del trabajo, y siguiendo con la línea del estudio de los poliésteres, nos hemos dedicado a la obtención de una estructura entrecruzada del L-láctido, donde éste forme parte de la cadena principal, además de poder controlar varias de sus propiedades (mecánicas, degradativas y su carácter hidrófobo).

Para ello y según lo descrito en el apartado 2.3.3.1, se obtuvo el poli(L-láctido) con los grupos OH α y ω terminales (ver figura 3.37), mediante una polimerización de apertura de anillo a partir del monómero cíclico de L-láctido haciéndolo reaccionar con los grupos OH del 1,6 hexanodiol (iniciador) a una temperatura de 180°C, utilizando como catalizador el 2-etil-hexanoato de estaño [266-269]. La utilización del iniciador con estructura simétrica, nos permitió obtener el macrómero de L-láctido (mLA) con grupos hidroxilos terminales.

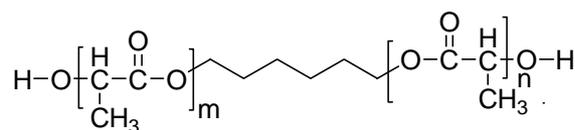


Figura 3.37. Estructura química de poli(L-láctido) diol

La reacción se llevo a cabo a temperatura de 180°C, ya que por debajo de ella se favorecen la formación de productos de bajo peso molecular. En la figura 2.2, se representa el diagrama de flujo de la reacción.

Una vez obtenido el poli(L-láctido) diol, lo hicimos reaccionar con el anhídrido metacrílico, mediante una reacción de esterificación, logrando de esa

manera la incorporación en la estructura química de los dobles enlaces necesarios para obtener las redes poliméricas por vía radical, tal y como se describe en el apartado 2.3.3.2 (ver figura 2.3 y 3.38).

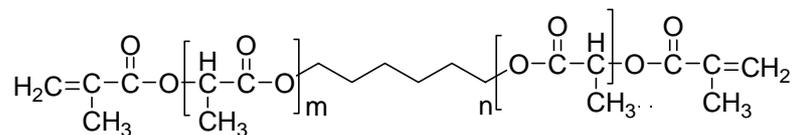


Figura 3.38. Estructura química de mLA

Una vez realizado los dos pasos de síntesis nos dimos a la tarea de caracterizar los productos obtenidos, tanto el poli(L-láctido) diol como el macromonomero (mLA). La figura 3.39 representa los espectros de FTIR de ambos productos.

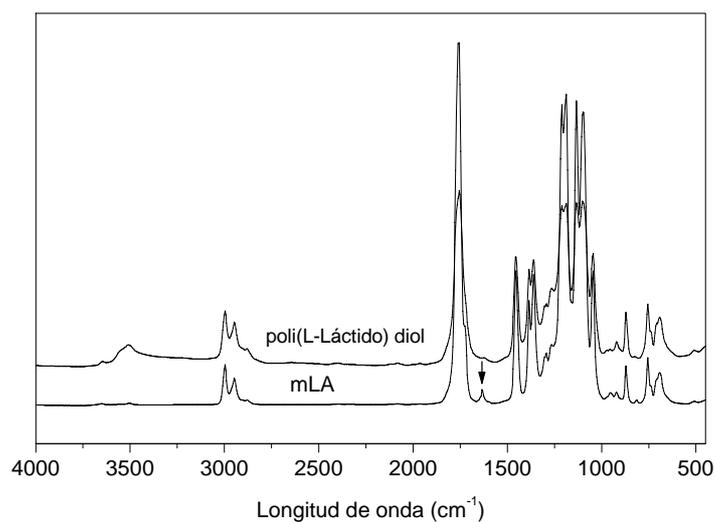
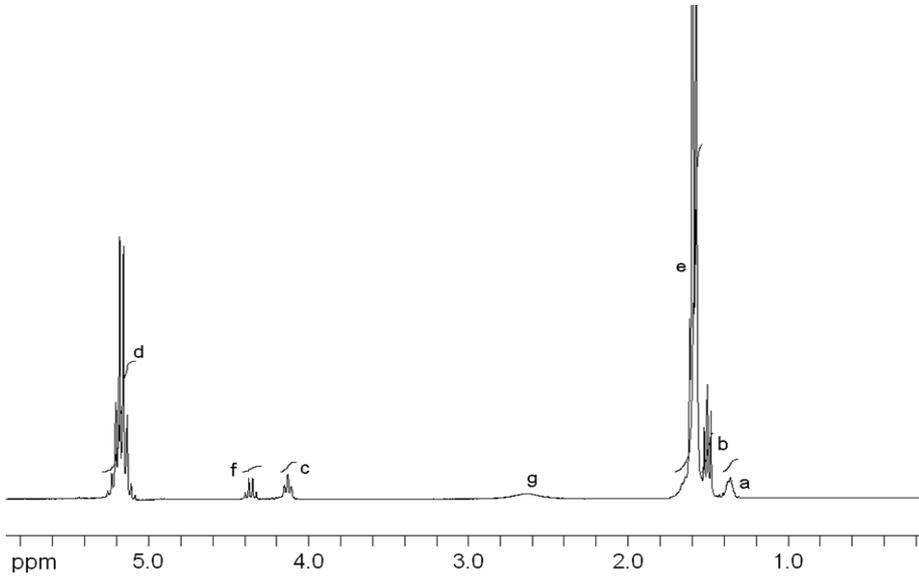
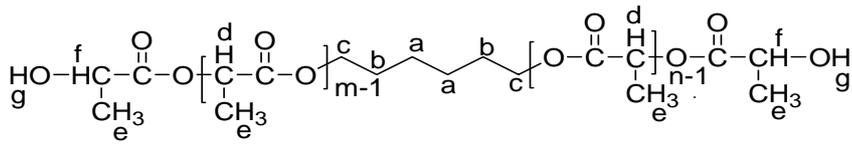


Figura 3.39. Espectros de FTIR del poli(L-láctido) diol y del mLA

3. Resultados y discusión

La banda que se observa alrededor de los 3600 a 3300 cm^{-1} en el caso del L-láctido diol se debe a la vibración de valencia de los grupos hidroxilos terminales del material, la cual no se observa en el caso del mLA, debido a la desaparición de dichos grupos funcionales producto a la reacción de esterificación entre el L-láctido diol y el anhídrido metacrílico. Otras modificaciones importantes en el espectro se observan a 1640 cm^{-1} , producto a las vibraciones C=C (ver flecha en la figura 3.39). Otras bandas significativas se localizan en los 1758 cm^{-1} debido a las vibraciones del grupo carbonilo C=O y las localizadas aproximadamente entre los 2980-2920 cm^{-1} debido a las vibraciones de valencia simétricas y antisimétricas de los CH_3 y CH_2 presentes tanto en el L-láctido diol como en el mLA.

La reacción de esterificación también fue comprobada por Resonancia Magnética Nuclear de protones ^1H -RMN. Los espectros del L-láctido diol y el mLA se muestran a continuación:



3. Resultados y discusión

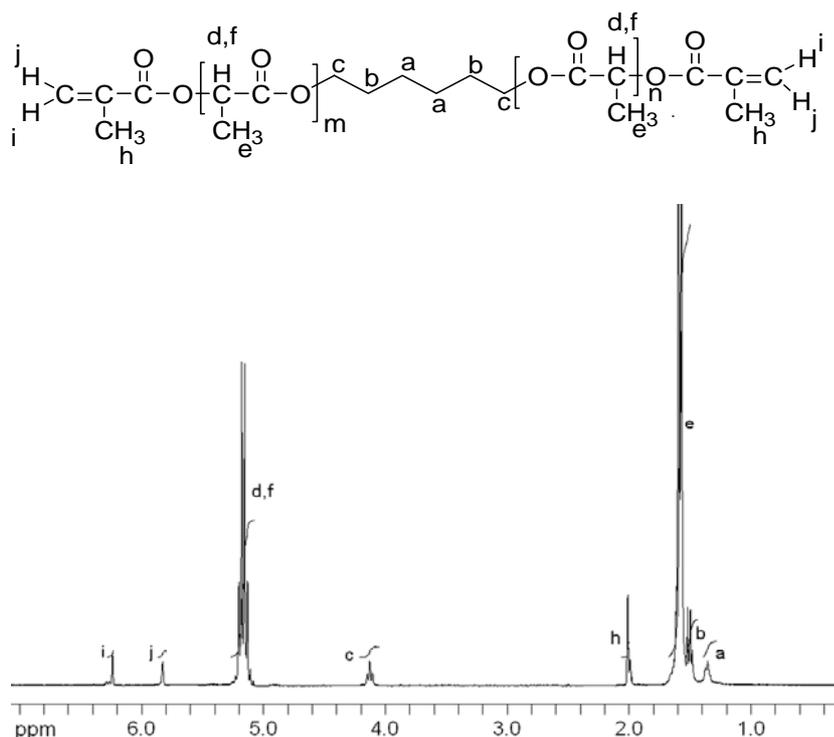


Figura 3.40. Espectros de ^1H -RMN del L-láctido diol (página anterior) y el mLA obtenidos a 500 MHz, en CDCl_3 .

El espectro del mLA muestra aparte de las señales asignadas para el L-láctido diol (ver figura 3.40), la aparición de nuevas señales como los dobletes localizados a 6.21 y 5.80 ppm que son atribuidas al CH_2 vinilo (i y j, respectivamente) del grupo metacrílico proveniente del anhídrido y el singlete localizado a 2.00 ppm que se atribuye al CH_3 (h) proveniente del mismo grupo.

La masa molar promedio en número fue calculada a partir de los resultados obtenidos por RMN, resultando en 3500 Da y además se calculó el rendimiento de la reacción, mediante las intensidades relativas de las señales

correspondientes al CH₂ (c) y una de los vinilos (j o i), obteniéndose un resultado del 75%. La incorporación de los grupos metacrilato permitió el fotoentrecruzamiento de los materiales.

3.3.1 Redes de poli(mLA) y de copolímeros de poli(mLA-co-HEA). Caracterización

Una vez obtenido el macromonómero (mLA), nos dimos a la tarea de obtener redes de homopolímero de éste y copolímeros con HEA, con el objetivo de estudiar la influencia del componente hidrófilo sobre sus propiedades mecánicas, degradativas, absorción de agua, etc. Para ello y como se ha descrito en el epígrafe 2.3.3.3, las redes de homopolímero de mLA se han obtenido mediante polimerización radicalica en solución, utilizando la benzoina como fotoiniciador. Es de destacar que las redes se han obtenido gracias a la favorable incorporación de los grupos metacrilatos en ambos terminales de cadena, brindándole a éste monómero la capacidad de reticular, dado su carácter tetrafuncional. Por otro lado y como se describe también en apartado 2.3.3.4, los copolímeros de poli(mLA-co-HEA) fueron obtenidos mediante copolimerización radicalica en solución, utilizando el mismo iniciador y variando las proporciones de ambos monómeros (ver tabla 2.3). Después de someter las muestras a un proceso de lavado y secado, para eliminar posibles residuos de oligómeros de bajo peso molecular, procedimos a su caracterización.

La figura 3.41 muestra los espectros de las redes de poli(mLA) y sus copolímeros.

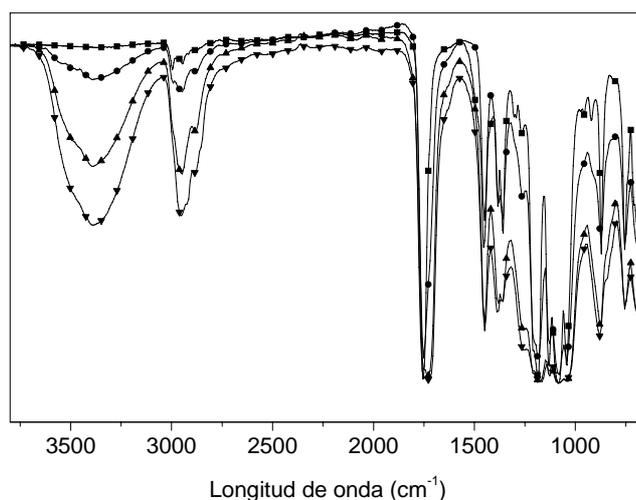


Figura 3.41. Espectros de ATR-FTIR de las redes de poli(mLA) (■) y sus copolímeros que contienen, (●)30 % HEA, (▲) 50% HEA, (▼)70% HEA.

La banda localizada en la región de los 3600-3200 cm^{-1} y que es típica de la vibración de valencia de los grupos OH, se incrementa con el contenido de HEA en la mezcla de alimentación. Otras bandas importantes son las localizadas a los 1727 cm^{-1} correspondiente a la vibración del grupo carboxilo de la estructura química y la localizada alrededor de los 2973-2868 cm^{-1} debido a las vibraciones de valencia simétricas y antisimétricas de los CH_3 y CH_2 de la cadena principal.

Por otro lado, las muestras (incluyendo el poli(L-láctido) diol, mLA y PHEA) fueron caracterizadas mediante de calorimetría diferencial de barrido (DSC), después de eliminar la historia térmica en los materiales, calentando hasta los 200°C durante 3 minutos y enfriando bruscamente a una velocidad de

40°C/min hasta los -100°C. El intervalo térmico de estudio fue desde -100°C hasta los 200°C (ver figura 3.42).

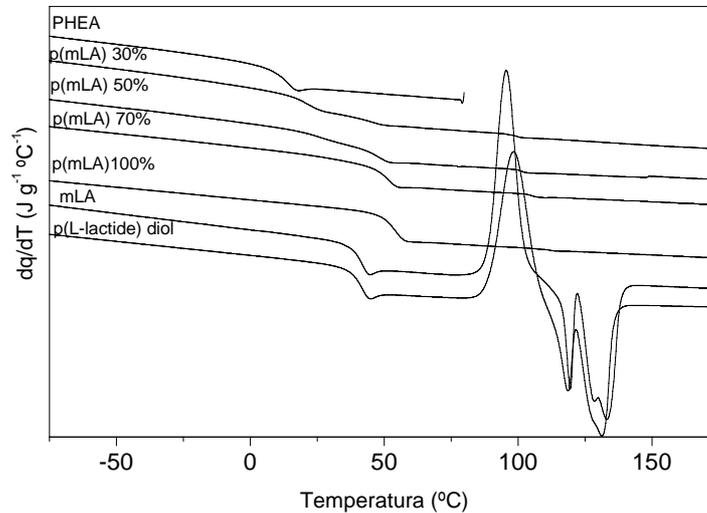


Figura 3.42. Curvas de DSC de las muestras obtenidas a 10°C/min, después de un proceso de enfriamiento.

Del tratamiento anteriormente presentado, primeramente podemos decir que el poli(L-láctido) diol y el mLA obtenidos presentan una temperatura de transición vítrea (T_g) alrededor de los 40°C, seguida de una exoterma de cristalización alrededor de los 95°C y su posterior endoterma de fusión. En relación a los homopolímeros, se ha obtenido una T_g en el caso del poli(mLA) alrededor de los 50°C y para las redes de PHEA a los 10°C. En el caso de los copolímeros se observa una superposición de dos procesos localizados entre los valores correspondientes a los homopolímeros puros. Además no se detectaron

3. Resultados y discusión

procesos de cristalización en las curvas de enfriamiento desde el fundido para ninguna red.

Otro de los ensayos realizados a las muestras fueron los estudios de degradación térmica (figuras 3.43 y 3.44).

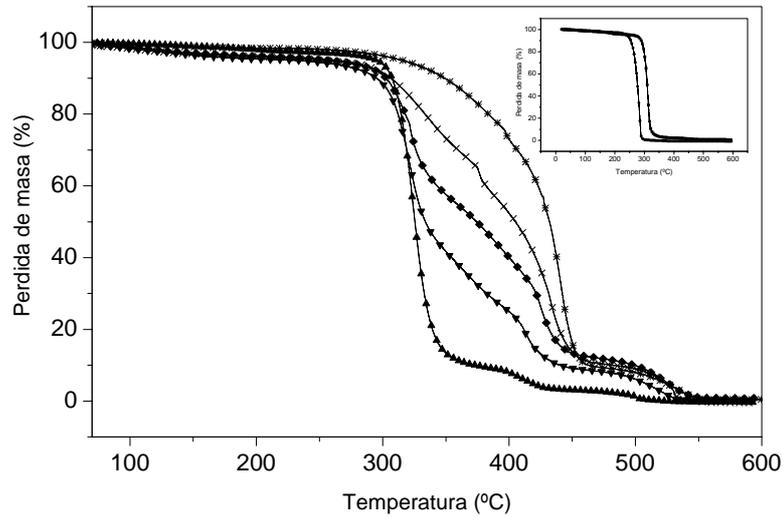


Figura 3.43. Relación entre la pérdida de masa relativa y la temperatura para todas las muestras. (■) poli(L-láctido) diol y (●) poli(L-láctido) macrómero (en el gráfico insertado), (▲) PmLA, (*)PHEA, y los copolímeros que contienen (▼) 30 % HEA, (◆) 50% HEA, (×) 70% HEA.

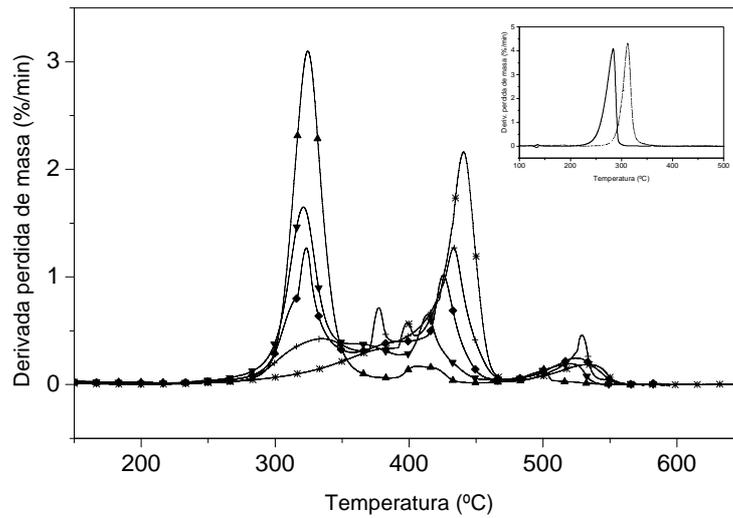


Figura 3.44. Relación entre la derivada de pérdida de masa y la temperatura para todas las muestras. (■) poli(L-láctido) diol y (●) poli(L-láctido) macrómero (en el gráfico insertado), (▲) PmLA, (*)PHEA, y los copolímeros que contienen (▼) 30 % HEA, (◆) 50% HEA, (+) 70% HEA

La figura 3.43, muestran los procesos de degradación térmica de nuestros materiales. No se detectó pérdida de masa por debajo de los 230°C en ninguna muestra y esto es debido a que no hay presencia de monómero residual en las redes poliméricas, el cual debía haberse evaporado a esa temperatura. La degradación comienza en el poli(L-láctido) diol alrededor de los 250°C y para el mLA alrededor de los 300°C, reflejando a nivel estructural las diferencias entre ambos compuestos. Por otro lado, las redes de mLA y sus copolímeros comienzan sus procesos de degradación también a los 300°C. Es

3. Resultados y discusión

de destacar que las curvas de los copolímeros están localizadas entre sus homopolímeros puros.

La pérdida de masa se observa más claramente en las curvas de la derivada de la pérdida de masa con la temperatura (figura 3.44), donde usando los máximos de las mismas podemos caracterizar los procesos degradativos, siendo su máximo el punto donde ocurre el proceso con mayor rapidez.

La degradación térmica para el poli(mLA), se ha observado que procede en tres pasos, los cuales llamaremos $\delta_1(325\text{ }^\circ\text{C})$, $\delta_2(410\text{ }^\circ\text{C})$ y $\delta_3(500^\circ\text{C})$. La pérdida de masa del PHEA procede también en tres etapas $\chi_1(390\text{ }^\circ\text{C})$, $\chi_2(450\text{ }^\circ\text{C})$ y $\chi_3(535^\circ\text{C})$. En el caso de los copolímeros fueron detectados tres pasos $\sigma_1(325\text{ }^\circ\text{C})$, $\sigma_2(450\text{ }^\circ\text{C})$ y $\sigma_3(535^\circ\text{C})$, donde (σ_2 y σ_3) dependen de la fracción másica de HEA en los copolímeros.

El módulo de almacenamiento y la tangente de pérdida de las redes copoliméricas se representan en las figuras 3.45 y 3.46.

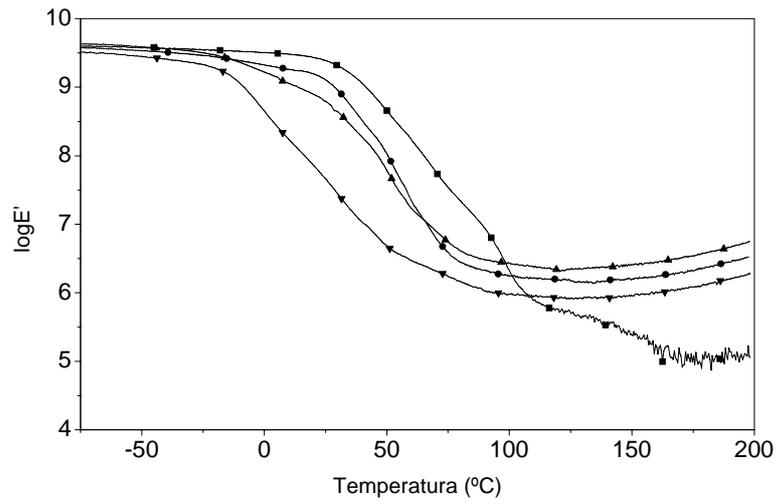


Figura 3.45. Módulo de almacenamiento ($\log E'$) de las redes copoliméricas, medido en calentamiento. Poli(mLA) (■) y sus copolímeros: (●) 30 % HEA, (▲) 50% HEA, (▼)70% HEA.

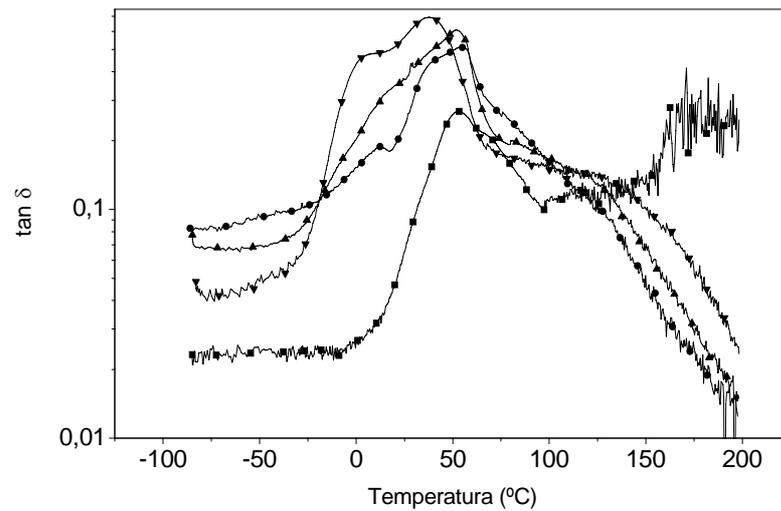


Figura 3.46. Tangente de pérdida de las redes copoliméricas. Poli(mLA) (■) y sus copolímeros: (●) 30 % HEA, (▲) 50% HEA, (▼)70% HEA.

Como podemos ver a temperaturas elevadas el módulo elástico se mantiene estable, lo cual es característico de redes poliméricas. El módulo de goma es aproximadamente 10^5 Pa para las redes de poli(mLA) y éste se incrementa con el incremento del contenido de HEA en los copolímeros. La relajación principal α_{mLA} es muy ancha (entre 30°C y 100°C) para las redes de poli(mLA) y muy empinada y estrecha (α_{HEA}) para las redes de PHEA a 25°C . El proceso de relajación principal para las redes copoliméricas es muy ancha y localizada entre los valores de los homopolímeros puros. Por otro lado, a medida que aumenta el contenido de HEA en los copolímeros el comportamiento del módulo con la temperatura tiende a dividirse en dos saltos y el proveniente de la relajación principal de las unidades de PHEA tiende a

desplazarse a menores temperaturas y α_{mLA} tiende a desplazarse a mayores temperaturas lo que nos hace pensar en la heterogeneidad de los dominios los cuales dan lugar a los procesos de relajación.

Cabe destacar que el último descenso para el módulo de las muestras de poli(mLA) (desde 100°C hasta 150°C) es debido a la fusión de la fracción de cristales presentes en la muestra sintetizada.

Mediante cálculos estequiométricos podemos brindar un estimado de la proporción de las unidades de HEA por unidades de mLA.

$$\frac{n_{HEA}}{n_{mLA}} = \frac{\omega_{HEA}}{1 - \omega_{HEA}} \frac{M_{mLA}}{M_{HEA}} \quad (17)$$

donde n es el número molar, ω_{HEA} es la fracción en masa de HEA en el sistema y M es la masa molecular. En la tabla 3.5 se reportan los valores calculados para los diferentes copolímeros usando la ecuación 17. La manera en la cual las unidades de HEA son incorporadas puede determinar tanto la arquitectura de las redes copoliméricas como sus propiedades.

3. Resultados y discusión

Tabla 3.5. Parámetros de la red. M_{PHEA} es la masa molar estequiométrica de PHEA entre nudos de entrecruzamiento, M es la masa molar promedio entre nudos de entrecruzamiento; E' módulo de almacenamiento medido a 175°C; M_c masa molar promedio entre nudos de entrecruzamiento medido a partir de la teoría de elasticidad del caucho

ω_{HEA}	n_{HEA}/n_{mLA}	M_{PHEA}	M	E' (MPa)	M_c
0	0	--	--	0.30	14795
0.3	13	750	1667	2.10	2250
0.5	30	1750	2333	2.50	1874
0.7	70	4083	3889	1.20	3993

El volumen específico de las redes copoliméricas disminuye al aumentar el contenido de HEA en las muestras, pero sus valores no dependen linealmente de la fracción de HEA en los copolímeros (ver figura 3.47) como ocurrió en las redes de poli(mCL-co-HEA). Se observa una caída de los valores de los copolímeros por debajo de la línea recta que unen los valores de sus correspondientes homopolímeros.

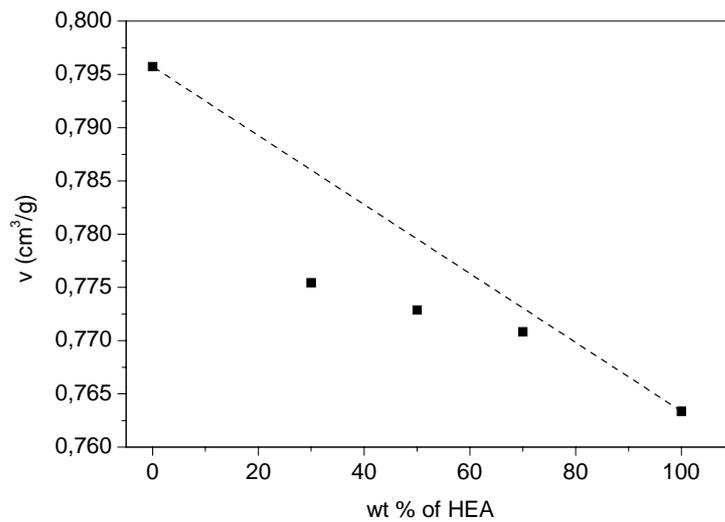


Figura 3.47. Volumen específico de poli(mLA), PHEA y de las redes copoliméricas en función de la fracción másica de HEA.

De los resultados expuestos hasta el momento en los ensayos de DSC y DMA, podemos hacernos una idea de la microestructura de las redes de los copolímeros. Con una fracción de HEA en el sistema (ω_{HEA}) de 0.3, existen 13 unidades de HEA por cadena de mLA, el desplazamiento hacia bajas temperaturas de la transición vítrea respecto al poli(mLA) nos dice que las cadenas de mLA son plastificadas por las unidades de HEA. No existen dominios puros de HEA lo suficientemente grandes para dar lugar a un proceso de T_g independiente (ver figura 3.42).

Al aumentar el contenido de HEA en el sistema $\omega_{\text{HEA}}=0.5$, se da el caso de formación de dos dominios ricos en uno u otro comonomero y dicha fracción de HEA continua plastificando las cadenas de mLA y dando lugar a que la T_g

3. Resultados y discusión

de la fase rica en mLA se desplace a bajas temperaturas. Con el incremento de la fracción de HEA hasta el valor de 0.7, el proceso de plastificación sucesivo que ha ocurrido hasta el momento ya no es efectivo sobre las unidades de mLA y la T_g de éstas se estabiliza, lo cual sugiere que las regiones de reordenamiento cooperativo en las que se producen los reordenamientos conformacionales de la fase rica en mLA (que a la temperatura de transición vítrea es de unos pocos nanómetros o decenas de nanómetros, contienen como mucho 30 unidades de HEA por unidad de mLA (ver tabla 3.5) y que 40 unidades de HEA por cadena de mLA (ver tabla 3.5) constituye un agregado lo suficientemente grande para dar un proceso de transición vítrea independiente. Claramente podemos decir que las unidades de HEA no constituyen micro/nano dominios puros y algunas cadenas de mLA participan en los reordenamientos cooperativos de los segmentos de HEA como se deduce del incremento de la T_g de la fase rica en HEA respecto de la del PHEA puro (figura 3.42).

Es claro que la estructura de red no impide la repulsión de los bloques hidrófilo e hidrófobo como han mostrado los resultados que se muestra en copolímeros poli(mCL-co-HEA) o poli(mLA-co-HEA). Los bloques del poliéster son suficientemente largos como para permitir que se agrupen para formar agregados de los que expulsan a las unidades hidrófilas.

La capacidad de absorción de agua de los copolímeros aumenta monótonamente con la cantidad de HEA en éstos (ver figura 3.48).

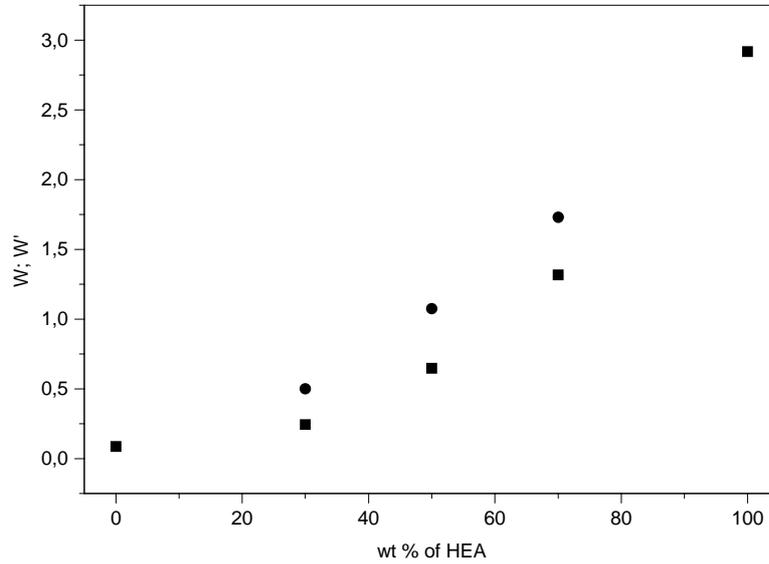


Figura 3.48. Contenido de agua en el equilibrio (w , ■) por unidad de masa de las muestras y por unidad de masa de HEA en los copolímeros (w' , ●).

La cantidad de agua absorbida por unidad de HEA en los copolímeros, w' se ha calculado mediante la siguiente ecuación:

$$w' = \frac{w - w_{mLA}(1 - \omega_{HEA})}{\omega_{HEA}}, \quad (18)$$

donde w_{mLA} es la capacidad de absorción de agua de las unidades de mLA.

3. Resultados y discusión

Esta magnitud depende de la composición y nunca alcanza el mismo valor que la absorción de agua en el equilibrio para las redes de homopolímero de HEA. Esta discrepancia nuevamente refuerza la idea de que las unidades de HEA en los copolímeros tienen un ambiente molecular diferente del que se forma en las fases homogéneas de PHEA. No obstante existe un incremento estable en w' que se observa en la figura 3.48 y que sugiere que los nanodominios ricos en HEA son más puros (menos cadenas de mLA están relacionadas) cuando el contenido de HEA en los copolímeros se incrementa.

Las redes de poli(mLA) están formadas por un macrómero tetrafuncional (ver figura 2.3). En los copolímeros son incorporadas unidades lineales de monómero de HEA ($116 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) en las proporciones que se representan en la tabla 3.5, por lo que podríamos pensar con todos los resultados hasta ahora planteados que la topología de las redes resultantes puede ser representadas como se ilustra en la figura 3.49, donde el número de unidades estequiométricas de HEA (b) son los reportados en la tabla 3.5.

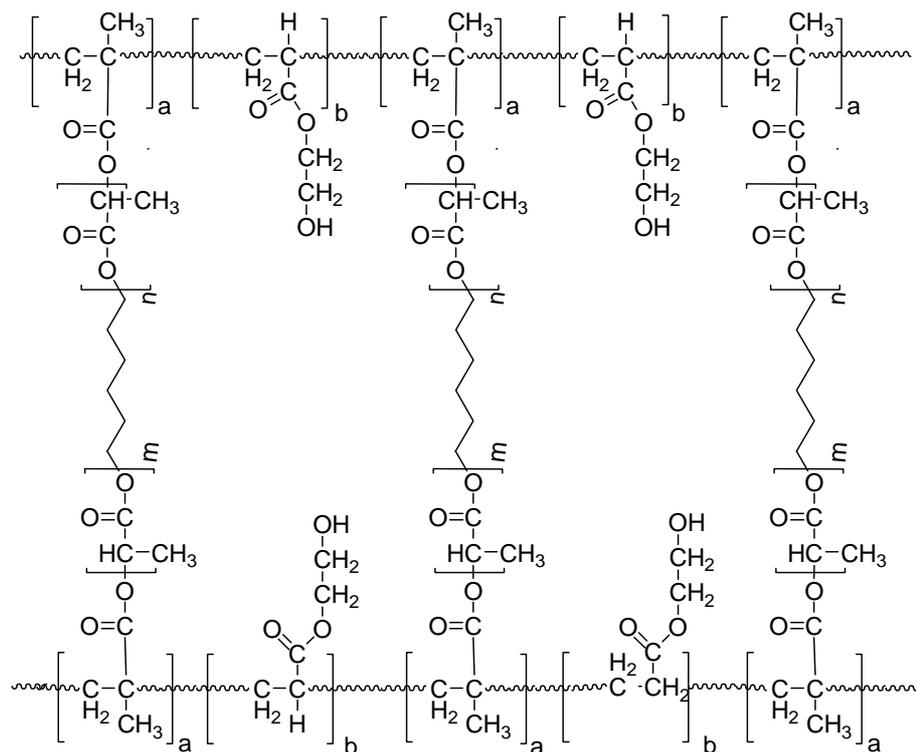


Figura 3.49. Figura ideal de las redes copoliméricas sugerida por las proporciones estequiométricas de los comonómeros y la caracterización físico-química. El número de unidades de HEA, llamadas b que están entre puntos de entrecruzamiento se reportan en la tabla 3.5.

La estructura ideal de la figura 3.49, se corresponde con el cálculo de la masa molecular promedio entre nudos de entrecruzamiento calculada a partir de la siguiente expresión:

3. Resultados y discusión

$M_{PHEA} = \frac{1}{2} \frac{n_{HEA}}{n_{mLA}} M_{HEA}$; donde la masa molecular promedio de la red es calculada de

acuerdo con la estructura de la figura 3.49, teniendo en cuenta la funcionalidad de las uniones ideales:

$$M = \frac{2}{3} M_{PHEA} + \frac{1}{3} M_{mLA}. \quad (19)$$

En la tabla 3.5 se reportan los valores calculados a partir de la ecuación 19.

Haciendo uso nuevamente de la teoría del caucho (phantom) y de la ecuación 13 y 14 se calculó la masa molecular promedio entre puntos de entrecruzamiento para estas redes, utilizando el valor experimental de E' en la región de goma. Los resultados se reportan en la tabla 3.5.

La masa molecular promedio en número entre puntos de entrecruzamiento calculada para las redes de poli(mLA) es mucho mayor ($M \sim 14000$ Da) que el peso molecular del macrómero de mLA usado como base para obtener las redes sintéticas de mLA ($M \sim 3500$ Da). Esto sugiere que las redes de poli(mLA) contienen un número de cadenas colgantes que no han formado parte de la cadena principal en el proceso de polimerización provocando consigo una baja conectividad en todo el material. Es por ello que podemos decir que la red del homopolímero de mLA es bastante más imperfecto que el que se representa en la figura 3.49, donde está perfectamente conectado (si $b=0$). Este resultado también es corroborado con los mayores valores del volumen específico de las redes de poli(mLA) si lo comparamos con el resto de copolímeros. No obstante, las predicciones de la ecuación 19, son factibles para el resto de los copolímeros de acuerdo con la estructura que

sugerimos y por otro lado, que el modelo ideal propuesto en la figura 3.49 es una figura física razonable para las redes copoliméricas.

Por último podemos decir que a pequeñas cantidades de unidades de HEA en los copolímeros (13 unidades de HEA por cadena de mLA) son capaces de interconectarse con las cadenas sueltas de mLA presentes en la estructura.

3.4 Síntesis de redes a base de los macrómeros de L-láctido (mLA) y ϵ -caprolactona (mCL).

Cumpliendo los objetivos trazados, hemos obtenidos redes de homopolímeros a base de ϵ -caprolactona y L-láctido, modificando químicamente sus estructuras y al copolimerizarlos con unidades HEA hemos obtenido copolímeros de éstos poliésteres con hidrofiliidad controlada. Para cumplir el último objetivo propuesto, sintetizamos copolímeros de ambos macrómeros y estudiamos sus propiedades.

Para ello y apoyándonos en el trabajo ya descrito, utilizamos el mismo procedimiento para obtener el mCL (epígrafe 2.3.2.1) y el mLA (epígrafe 2.3.3.1 y 2.3.3.2). Una vez obtenido los macrómeros, procedimos a la copolimerización de ambos como se describe en el apartado 2.3.4.1.

Se caracterizó mediante FTIR-ATR tanto el mCL, la mLA y sus copolímeros con diferentes composiciones (ver tabla 2.4) lo cual se representa en la figura 3.50.

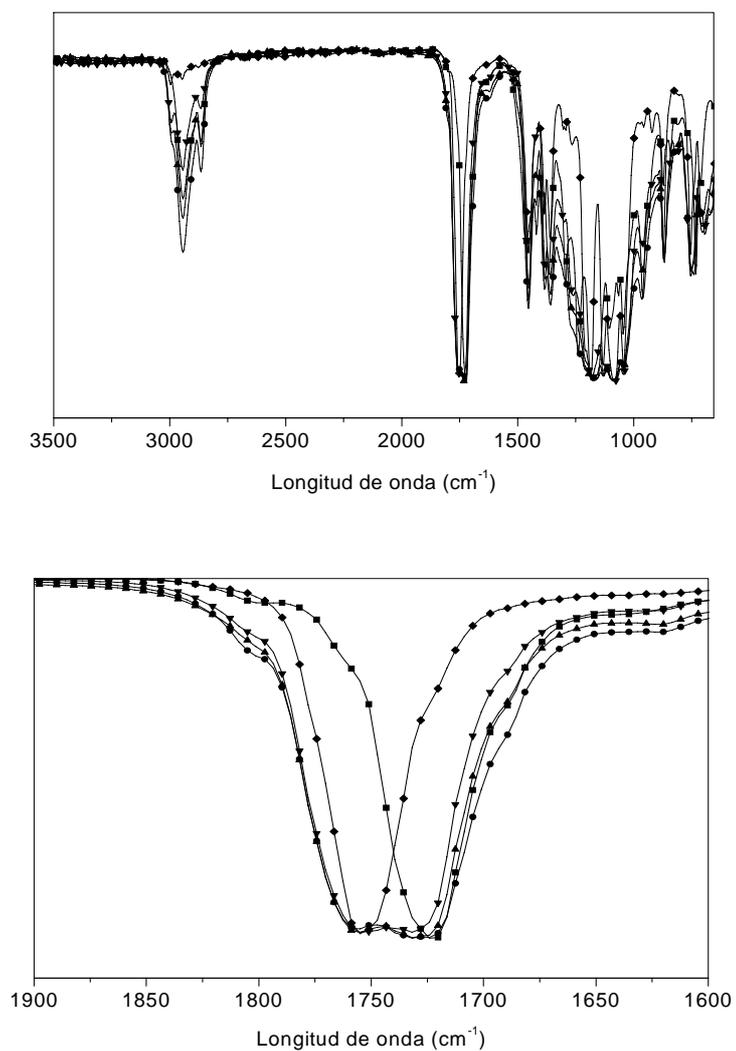


Figura 3.50. Espectros de ATR-FTIR de las redes de poli(mLA) (◆), las redes de mCL (■) y sus copolímeros que contienen, (•, 70% mCL), (▲, 50% mCL) y (▼, 30% mCL) (arriba). Ampliación de la banda correspondiente a los grupos carboxilos de todas las muestras (abajo).

Las estructuras químicas de ambos macrómeros y sus copolímeros hacen que los espectros de ATR-FTIR sean muy parecidos. Se observan las bandas correspondientes a las vibraciones de valencia simétricas y antisimétricas de los CH₃ y CH₂ en los 2973-2868 cm⁻¹ y también las localizadas entre los 1760 y 1727 cm⁻¹ correspondiente a la vibración de los grupos carboxilos de las estructuras químicas. En la figura 3.50 (abajo) podemos observar como las bandas de los grupos carboxilatos de las redes de poli(mLA) están localizadas a los 1760 cm⁻¹ y los de las redes de p(mCL) están en los 1725 cm⁻¹ indicando los diferentes comportamientos de un mismo grupo funcional incluso en compuestos de una misma familia química, en este caso los poliésteres. Los copolímeros presentan las bandas de C=O entre los 1760 y 1727 cm⁻¹ como habíamos comentado anteriormente indicando la existencia de ambos macrómeros en los copolímeros.

La figura 3.51 representa los estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de los homopolímeros y los copolímeros con las distintas composiciones (ver tabla 2.4) a una velocidad de 10°C/min, después de borrar la historia térmica previa que pudieran poseer los materiales (estando 5 minutos a 200°C) y enfriando desde el fundido a 10°C/min.

3. Resultados y discusión

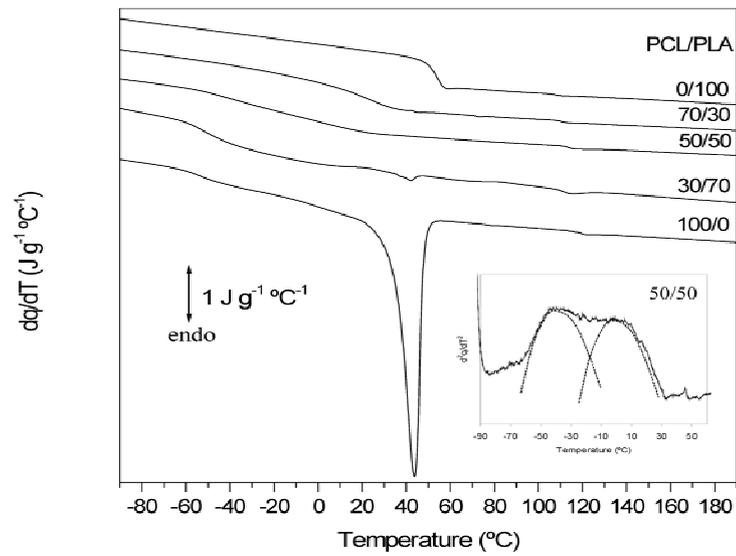


Figura 3.51. Curvas de DSC de las muestras obtenidas a $10^{\circ}C/min$, después de un proceso de enfriamiento.

Pudimos observar un proceso de transición vítrea para las redes de p(mLA) a $58^{\circ}C$. Las redes de p(mCL) presentan dos pasos endotérmicos: la T_g aproximadamente a los $-50^{\circ}C$ y un pico de fusión con un máximo en los $45^{\circ}C$. Para las redes copoliméricas, al incrementarse el contenido de mCL, la T_g del p(mLA) se desplaza hacia bajas temperaturas: $T_g=30^{\circ}C$ para el copolímero de mCL/mLA 70/30. Las redes que contienen una composición de 50/50 parecen tener una única y ancha T_g localizada entre los valores de sus homopolímeros puros. Sin embargo profundizando un poco más en este comportamiento hemos calculado la derivada del flujo de calor vs. temperatura y se ha demostrado que el proceso de T_g para este copolímero no es mas que la superposición de los procesos de T_g de ambos componentes.

Los copolímeros con mayores contenidos de mCL, por ejemplo las muestras de contenido 70/30 (mCL/mLA), muestran una clara T_g aproximadamente a -50°C y una segunda (asociada a cadenas de mLA) parcialmente solapada con una pequeña endoterma la cual corresponde al proceso de fusión de los dominios de p(mCL).

El módulo de almacenamiento y la tangente de pérdida de las redes copoliméricas se representan en la figura 3.52.

3. Resultados y discusión

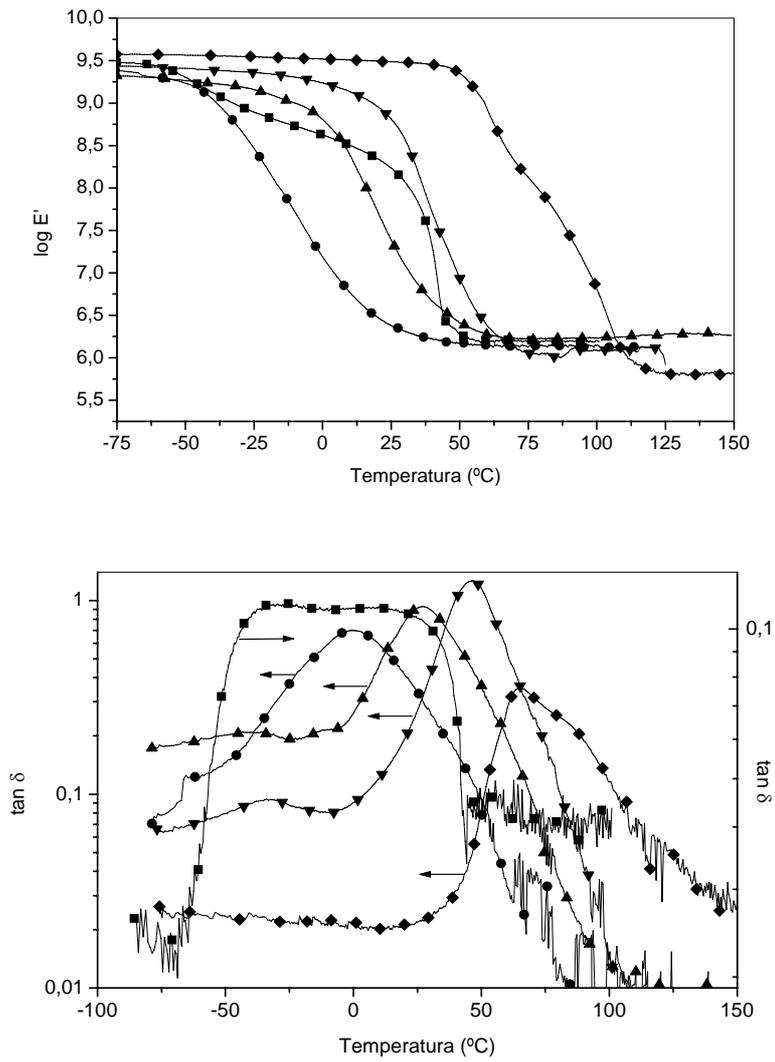


Figura 3.52. Módulo de almacenamiento ($\log E'$) (arriba) y tangente de pérdida (abajo) de las redes copoliméricas, medido en calentamiento. Poli(mCL) (■), Poli(mLA) (◆) y sus copolímeros: (●) 30 % mLA, (▲) 50% mLA, (▼)70% mLA.

A bajas temperaturas, todas las muestras presentaron un valor alto del módulo de almacenamiento, aproximadamente entre 3 y 4×10^9 Pa a -75 °C, característico de los polímeros vítreos o semicristalinos con fases amorfas y cristalinas. Como habíamos visto anteriormente, el módulo de goma de la red de poli(mCL) es la típica de un elastómero (aprox. 10^6 Pa) y el módulo de goma de las redes de poli(mLA) es aproximadamente 10^5 Pa. Para los copolímeros, la muestra que presenta un 70% de mCL el módulo es muy parecida a las redes del macrómero y comienza a disminuir a medida que el contenido de mLA aumenta en las mezclas. La figura 3.52 (abajo) ilustra una relajación amplia en un rango de temperaturas de entre -40 °C y 40 °C para las redes de p(mCL), que involucra la relajación principal de las cadenas de p(mCL) a una temperatura de -35 °C y un proceso de fusión de los cristales de la fase cristalina que tiene su máximo a los 15 °C. La relajación principal α_{mLA} es también amplia (entre 30 °C y 100 °C) para las redes de poli(mLA).

Cuando se compara el espectro dinámico-mecánico del copolímero que contiene un 30% de mCL con el poli(mLA) puro, se ve que el pico de $\tan \delta$ correspondiente a la relajación principal del poli(mLA) se desplaza marcadamente hacia bajas temperaturas, pero aparece ya un pequeño pico en la región de la relajación principal del poli(mCL), algo que no se detecta en los ensayos de DSC. El mismo comportamiento se muestra en el copolímero con el 50% de mCL con un desplazamiento más marcado del pico acompañado de un ensanchamiento, pero también con restos del pico en la región del poli(mCL). La muestra que contiene un 70% muestra un único pico muy ancho. Todo ello es indicativo de una gran miscibilidad entre las cadenas de los dos macrómeros, a pesar de que puedan existir pequeños agregados de poli(mCL), es de destacar que no se aprecia una fase de poli(mLA) puro. Por otra parte es interesante destacar que en los copolímeros prácticamente no aparece pico de fusión de la

3. Resultados y discusión

poli(mCL) en la región de alrededor de 40°C, es decir si se forman pequeños agregados de poli(mCL), no tienen el tamaño suficiente para cristalizar y que la cristalización de la poli(mCL) partiendo de la mezcla homogénea con mLA no se produce. Es de destacar que la cristalización del poli(mCL) es más rápida que la del poli(mLA), como también ocurre en el caso de los homopolímeros PCL y PLLA. Las mezclas de PCL y PLLA presentan separación de fases y la cinética de cristalización en la fase de PCL de la mezcla prácticamente no se ve afectada por la presencia del PLLA. Posiblemente en nuestras redes de copolímero, la conectividad entre los macrómeros fuerza a las cadenas a compartir el mismo espacio y restringe la capacidad de reordenamiento necesaria para el crecimiento de los cristales. Cuando se compara la anchura de la transición vítrea y de la relajación principal dinámico-mecánica especialmente en copolímeros ricos en mCL con la de los sistemas anteriores que combinan a uno u otro macrómero con HEA, demuestra que la compatibilidad entre los dos poliésteres es mucho mayor que con el componente hidrófilo.

Las curvas de los estudios de degradación térmica para todas las muestras sintetizadas se observan en la figura 3.53 y 3.54.

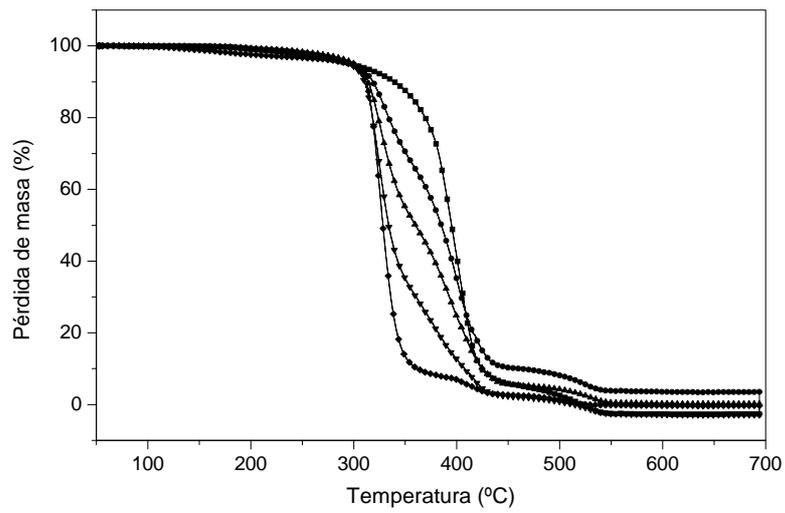


Figura 3.53. Relación entre la pérdida de masa relativa y la temperatura de las redes de poli(mLA) (◆), las redes de PCL (■) y sus copolímeros que contienen, (●, 70% PCL), (▲, 50% PCL) y (▼, 30% PCL).

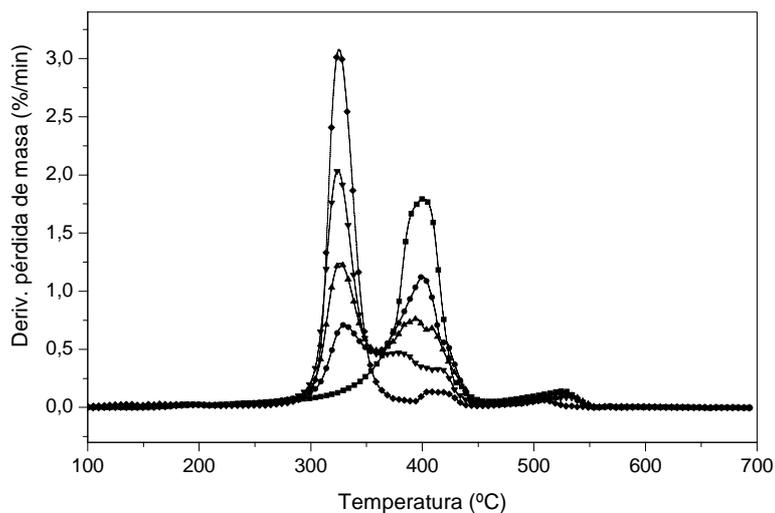


Figura 3.54. Relación entre la derivada de la pérdida de masa relativa y la temperatura de las redes de poli(mLA) (◆), las redes de PCL (■) y sus copolímeros que contienen, (•, 70% PCL), (▲, 50% PCL) y (▼, 30% PCL).

No se detectó pérdida de masa por debajo de los 230°C en ninguna muestra de las utilizadas en los estudios de degradación térmica (ver figura 3.53) y esto es debido a que no hay presencia de monómero residual en las redes poliméricas.

La degradación comienza en el poli(mLA) y sus copolímeros alrededor de los 300°C. Es de destacar que las curvas de los copolímeros están localizadas entre sus homopolímeros puros.

Analizando el gráfico de la derivada de pérdida de peso vs. temperatura (ver gráfico 3.54), pudimos caracterizar los procesos degradativos, utilizando el máximo valor que es donde ocurre el proceso con mayor rapidez. La

degradación térmica para el poli(mLA), ocurrió en tres pasos, los cuales ya hemos llamado en el apartado 3.3.1 $\delta_1(325\text{ }^\circ\text{C})$, $\delta_2(415\text{ }^\circ\text{C})$ y $\delta_3(510^\circ\text{C})$. La pérdida de masa de las redes de p(mCL) procede en dos etapas $\lambda_1(405\text{ }^\circ\text{C})$ y $\lambda_2(545\text{ }^\circ\text{C})$.

Analizando los resultados de los copolímeros vimos que los procesos de degradación transcurren en tres pasos para el caso del material con un 70% de mCL, $\varphi_1(325\text{ }^\circ\text{C})$, $\varphi_2(400\text{ }^\circ\text{C})$ y $\varphi_3(530^\circ\text{C})$, donde (φ_2 y φ_3) dependen de la fracción másica de mCL en el copolímero. Para el caso de los materiales con un 50 y 30 % de mCL, los procesos de degradación transcurren en cuatro pasos $\varphi_1(325\text{ }^\circ\text{C})$, $\varphi_2(\approx 393\text{ }^\circ\text{C})$, $\varphi_3(\approx 415^\circ\text{C})$ y $\varphi_4(530^\circ\text{C})$, donde φ_2 se desplazan a bajas temperaturas a medida que el contenido de mLA aumenta.

Mediante cálculos estequiométricos podemos brindar un estimado de la proporción de las unidades de ambos macrómeros en los copolímeros sintetizados.

$$\frac{n_{mCL}}{n_{mLA}} = \frac{\omega_{mCL}}{1 - \omega_{mCL}} \frac{M_{mCL}}{M_{mLA}} \quad (20)$$

donde n es el número molar, ω_{mcl} es la fracción en masa de mCL en el sistema y M es la masa molecular. En la tabla 3.6 se detallan los valores calculados para los diferentes copolímeros usando la ecuación 20.

3. Resultados y discusión

Tabla 3.6. Parámetros de la red. M es la masa molar promedio entre nudos de entrecruzamiento; E' módulo de almacenamiento y M_c ; masa molar promedio entre nudos de entrecruzamiento medido a partir de la teoría de elasticidad del caucho

ω_{mCL}	n_{mCL}/n_{mLA}	M	E' (MPa)	M_c
0	0	3500	0.30	12648
0.3	0.25	2857	1.25	3039
0.5	0.60	2545	1.38	2718
0.7	1.38	2295	1.54	2391
1	-	2170	1.62	2282

El volumen específico de las redes copoliméricas disminuye al aumentar el contenido de mLA en las muestras, pero sus valores no dependen linealmente de su fracción en los copolímeros (ver figura 3.55).

Se observa en las redes de los copolímeros valores por encima de la línea recta que une los valores de sus correspondientes homopolímeros. Es interesante destacar la diferencia respecto a los dos sistemas anteriores que combinan bloques hidrófilos e hidrófobos que presentaban volumen de exceso negativo o nulo. Para explicar este resultado es necesario tener en cuenta la mayor miscibilidad de este sistema, comentada antes y también la especial topología de la red que discutiremos más adelante a partir de los cálculos de las longitudes de cadena efectiva entre puntos de entrecruzamiento.

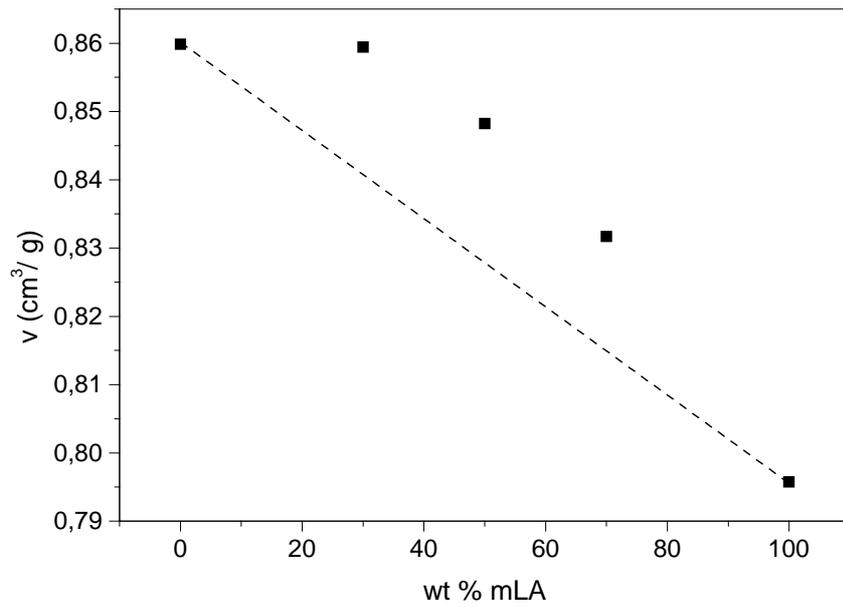


Figura 3.55. Volumen específico de poli(mLA), poli(mCL) y de las redes copoliméricas en función de la fracción másica de mLA.

Este resultado sugiere que la habilidad de empaquetamiento de los copolímeros es peor que la de las redes puras, lo que puede llevar a que el volumen de estos (copolímeros) sea mayor y su comportamiento no sea la superposición lineal de ambos componentes. Estas interacciones fueron detectadas también en los ensayos de DSC, a través de las modificaciones de la T_g en las redes de los copolímeros (ver figura 3.51). Vale destacar que los procesos de cristalización que ocurren en el poli(mCL) y muy levemente en los copolímeros con un contenido del 70% de mCL no ocurre en el resto de los copolímeros, debido a la topología en la estructuras de los copolímeros.

3. Resultados y discusión

De los resultados expuestos hasta el momento en los ensayos de DSC y DMA, podemos hacernos una idea de la microestructura de las redes de los copolímeros. Con una fracción de mCL en el sistema (ω_{mCL}) menor que 0.3, existen 0.25 unidades de mCL por unidad de mLA, lo cual nos dice que el sistema consiste en un mayor empaquetamiento de cadenas de mLA que de mCL. No obstante no existen dominios puros de mLA lo suficientemente grandes para dar lugar a un proceso de T_g independiente (ver figura 3.51).

Por todo lo planteado hasta el momento podríamos pensar que la topología de las redes resultantes puede ser representada como se ilustra en la figura 3.56, donde el número de unidades estequiométricas de mCL (a) y mLA (b) son los reportados en la tabla 3.6.

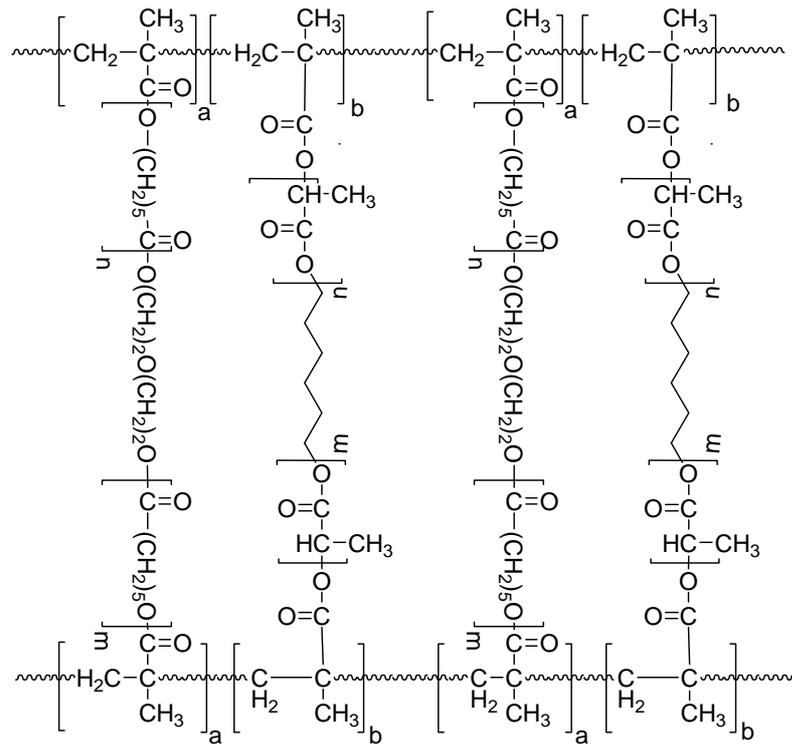


Figura 3.56. Figura ideal de las redes copoliméricas sugerida por las proporciones estequiométricas de los comonómeros y la caracterización físico-química. El número de unidades de mCL (a) y mLA (b) que están entre puntos de entrecruzamiento se reportan en la tabla 3.6.

Haciendo uso nuevamente de la teoría del caucho y de la ecuación 13 y 14 pudimos calcular la masa molecular promedio entre puntos de entrecruzamiento para estas redes, utilizando el valor experimental de E' en la región de goma. Los resultados se ilustran en la tabla 3.6.

3. Resultados y discusión

La masa molecular promedio en número entre puntos de entrecruzamiento calculada para las redes de poli(mLA) es mucho mayor ($M \sim 12648$ Da) que el peso molecular del macrómero usado como base para obtener las redes sintéticas de mLA ($M \sim 3500$ Da). Esto sugiere que las redes de poli(mLA) contienen un número de cadenas colgantes debido a la escasez de conectividad en todo el material. Es por ello que podemos decir que el homopolímero de mLA es bastante más imperfecto que el que se representa en la figura 3.56, donde está perfectamente conectado (si $b=0$).

Por último podemos decir que para el resto de los copolímeros sus estructuras químicas son más parecidas al modelo propuesto en la figura 3.56. Al copolimerizar el p(mLA) con el p(mCL) y sin tener en cuenta la composición de los copolímeros resultantes, unidades de mCL con capaces de reaccionar con los dobles enlaces del macrómero de p(mLA), disminuyendo el número de cadenas que no han reaccionado (como es el caso del homopolímero de p(mLA)) y dando lugar a un material de microestructura continua entre las fases, lo que nos parece que podría ser la explicación al resultado que los valores de la masa molecular promedio entre puntos de entrecruzamiento obtenidos por las ecuaciones 13 y 14 se ajusten claramente a los valores reales obtenidos por las propiedades mecánicas

Conclusiones

4. Conclusiones

1. Se ha preparado una familia de sustratos biodegradables basados en la policaprolactona y el ácido poliláctico en los que se modula la capacidad de absorber agua, es decir, la hidrofiliidad del sistema. Los nuevos materiales sintetizados presentan los grupos degradables en diferente topología (sustituyente de la cadena principal, CLMA, y constituyente de la misma, mCL y mL). Las principales conclusiones en cuanto a sus propiedades físico-químicas y de aplicación a la ingeniería tisular se presentan a continuación.
2. Se obtuvieron las redes copoliméricas de poli(CLMA-co-HEA) mediante copolimerización vía radical, llegando a la conclusión de que presentaban una estructura al azar de ambos monómeros. Teniendo en cuenta que la copolimerización fue en solución (DMF), buen solvente para el poli(CLMA) y mal solvente para el PHEA, el material resultante mostró una estructura de nanoporos con el incremento del contenido de HEA en los copolímeros, producto a la separación de fases en el proceso de polimerización.
3. Se obtuvieron scaffolds con estructura de poros esféricos interconectados, con tamaño de poros de alrededor de 90 μ m de los materiales de poli(CLMA-co-HEA) y se estudiaron sus propiedades mecánicas en función del contenido de HEA en el sistema dando como resultado que al aumentar la hidrofiliidad disminuye el módulo de Young debido a una disminución del tamaño de la cadena polimérica entre puntos de entrecruzamiento.

4. Conclusiones

4. Se realizó un estudio del comportamiento de las GBMCs en los scaffolds preparados obteniéndose una elevada adhesión y proliferación celular en las muestras con un mayor contenido de CLMA, así como la diferenciación de éstas a tejido óseo. Además pudimos comprobar que al aumentar el componente hidrófilo en las muestras disminuyen dichas propiedades.
5. Se describió un método para la obtención de un macrómero de ϵ -caprolactona mediante una reacción de esterificación entre la poli(ϵ -caprolactona) diol con el anhídrido metacrílico capaz de reticular por sí mismo. Se obtuvieron copolímeros de poli(mLA-co-HEA) con diferentes composiciones con el objetivo de obtener materiales con hidrofiliidad controlada. El nuevo sistema que consiste en microdominios de ambos comonómeros, presentó un carácter semicristalino siendo mecánicamente estable a altas temperaturas. Por otro lado, se ha sugerido la posible arquitectura de las redes copoliméricas, consistiendo en una unión trifuncional en la que dos bifurcaciones eran de PHEA (con diferentes longitudes en dependencia de la composición de HEA en la mezcla) y una del macrómero de mCL, concordando con la predicción de la teoría Fantasma de la elasticidad del caucho, propuesta en éste documento para éstas redes. Es de destacar que con este sistema polimérico también se fabricaron scaffolds con estructura de poros esféricos interconectados de 90 μm de diámetro.

4. Conclusiones

6. Se describe un método de obtención de un macrómero de L-láctido, capaz de fotopolimerizar por sí mismo. Primeramente se obtiene mediante polimerización por apertura de anillo el poli(L-láctido) diol, el cual se hace reaccionar con anhídrido metacrílico y se obtiene el deseado macrómero. Se sintetizaron copolímeros de HEA en diferentes proporciones obteniéndose una variedad de materiales con hidrofiliidad controlada. Se realizó una caracterización tanto química como mecánica dando como resultados materiales mecánicamente estables con microdominios de ambos comonomeros.
7. Se realizó la síntesis mediante copolimerización vía radical de ambos macrómeros (mCL y mLA) con diferentes contenidos. Se caracterizaron los sistemas tanto química como mecánicamente obteniendo como resultado materiales con (micro)separación de fases, una que consiste en regiones puras de mCL lo suficientemente grandes como para comportarse como macrómero puro y la otra en los que unidades de caprolactona se mezclan con cadenas de mLA.
8. También se describe en el documento la síntesis mediante copolimerización vía radical de ambos macrómeros (mCL y mLA) con diferentes contenidos. Se caracterizaron los sistemas tanto química como mecánicamente obteniendo como resultado materiales con separación de fases, una que consiste en regiones puras de mCL lo suficientemente grandes como para comportarse como macrómero puro y la otra en los que unidades de caprolactona se mezclan con cadenas de mLA.

4. Conclusiones

9. Por último podemos decir que las líneas futuras de esta investigación estarán centradas en la fabricación de scaffolds de éstos materiales para la regeneración ósea y el diseño de nuevos materiales en los que la unión química entre estas nuevas estructuras y secuencias de aminoácidos sea una realidad permitiendo con ello una mayor interacción entre los cultivos celulares y los futuros materiales.

Abreviaturas

SnOct ₂	Octanoato de estaño
Zn-(Acac) ₂	Cinc bis(2,2-dimetil-3,5-heptanodionato- <i>O,O'</i>)
PET	Poli (etilen tereftalato)
ROP	Polimerización por apertura de anillo
S _N 2	Sustitución nucleofílica bimolecular
DXO	1,5-dioxapan-2-ona
β-PL	β-propiolactona
γ-BL	γ-butirolactona
β-BL	β-butirolactona
δ-VL	δ-valerolactona
ε-CL	ε-caprolactona
GA	Glicólido
LA	Láctido
FDA	Administración Americana de Fármacos y Alimentos
D-LA	D,L-láctido
L-LA	L,L láctido
R·	Radicales libres
T _g	Temperatura de transición vítrea
E'	Módulo de Young
PDLLA	Poli (D,L-láctido)
PLLA	Poli (L,L-láctido)
PCL	Poli (ε-caprolactona)
T _m	Temperatura de fusión
PVC	Poli (cloruro de vinilo)

ECM	Matriz extracelular
β -TCP	β -fosfato tricálcico
HA	Ácido hialurónico
BGP	Bone Gla-protein
gla	Gamma-carboxy glutamic acid
PTH	Hormona paratifoidea
MSC	Células mesenquimales
CFU-GM	Células formadoras de granulocitos y macrófagos
RANK	Factor nuclear kappa B
CLMA	Caprolactona 2-(metacrililoiloxi)etil ester
HEA	Acrilato de 2-hidroxietilo
EGDMA	Dimetacrilato de etilenglicol
AIBN	2,2'Azobisisobutironitrilo
MA	Anhídrido Metacrílico
DMF	N,N-Dimetilformamida
GBMCs	Células mesenquimales provenientes de médula ósea de cabras adultas
FBS	Suero bovino-fetal
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
α -MEM	Minimal Essential Medium Eagle, modificación alfa
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2(4-sulfonil)-2H tetrasolium
$\tan \delta$	Tangente de pérdida
PMMA	Polimetacrilato de metilo
PBS	Solución salina de buffer fosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Tris-EDTA	Tris-ácido etilendiaminotetracético
ALP	Fosfatasa alcalina

BS	Solución de bloqueo
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
ANOVA	Análisis de varianza
mCL	Macrómero de PCL
mLA	Macrómero de PLA
CLMA	Caprolactona 2-(metacrililoiloxi)etil éster
D_{ap}	Coefficientes de difusión aparente
RGD	Arginina-guanina-ácido aspártico
Col I	Colágeno tipo I
FD	Grado de funcionalización
ΔH_m	Entalpía de fusión
ΔH_c	Entalpía de cristalización
$\Delta H_{c,calentamiento}$	Entalpía de cristalización en calentamiento
n_{HEA}/n_{mCL}	Número de moles de HEA por unidad de mCL en la red
ω_{HEA}	Fracción en masa de HEA
M_{PHEA}	Masa molar estequiométrica de PHEA entre nudos de entrecruzamiento
M_c	Masa molar promedio entre nudos de entrecruzamiento, según la teoría de elasticidad del caucho
1H RMN	Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear
FTIR	Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DMA	Análisis dinámico mecánico
DTGA	Análisis termogravimétrico
DRS	Espectroscopia de relajación dieléctrica
SEM	Microscopía Electrónica de barrido
μ -CT	Tomografía micro-computarizada

Referencias

- [1] Kricheldorf H.R., Kreiser-Saunders I., Stricker A., *Macromolecules*, **33**, 702 (2000)
- [2] Nijenhuis A.J., Grijpma D.W., Pennings A.J., *Macromolecules*, **25**, 6419 (1992)
- [3] Tian D., Dubois P., Grandfils C., Jerone J., *Macromolecules*, **30**, 406 (1997)
- [4] Arvanitoyannis I.S., *J. Macromol. Sci. Revs. Macromol. Chem. Phys. C.*, **39**, 205 (1999)
- [5] Zaldívar D., Peniche C., Gallardo A., Román J.S., *Biomaterials*, **14**, 1073 (1993)
- [6] Huang S.J., Edelman P.G., Han Y.K., *J Macromol Sci Chem A*, **25**, 847 (1988)
- [7] Kharas G.B., Kamenetsky M., Simantirakis J., Beinlich K.C., Rizzo A.M.T., Caywood G.A., Watson K., *J Appl Polym Sci.*, **66**, 1123 (1997)
- [8] Muggli D.S., Burkoth A.K., Keyser S.A., Lee H.R., Anseth K.S., *Macromolecules*, **31**, 4120 (1998)
- [9] Griffith L.G., *Acta Mater*, **48**, 263 (2000)
- [10] Jagur-Grodzinski J., *Reactive Functional Polym*, **39**, 99 (1999)
- [11] Yaszemski J.M., Payne R.G., Hayes W.C., Langer R.S., Aufdemorte T.B., Mikos A.G., *Tissue Eng.*, **1**, 41 (1995)
- [12] Tobin G., Wilson H., US Patent 4 843 112 (1989)
- [13] Han D.K., Hubbell J.A., *Macromolecules*, **30**, 6077 (1997)
- [14] Tian D., Dubois P., Jérôme R., *J Polym Sci A*, **35**, 2295 (1997)
- [15] Shastri V., Langer R.S., Tarcha P.J., US Patent 5 837 752 (1998)
- [16] Helminen A., Korhonen H., Seppälä J.V., *J Appl Polym Sci*, **81**, 176 (2001)

- [17] Varma D.S., Maheshwari A., Gupta V., Varma I.K., *Angew Makromol. Chem.*, **90**, 23 (1980)
- [18] Varma D.S., Negi Y.S., Veena, Varma I.K., *ACS Polym. Prep. Div. Polym.*, **24**, 245 (1983)
- [19] Varma D.S., Agarwal R., Varma I.K., *Brit. Polym. J.*, **24**, 245 (1985)
- [20] Varma D.S., Agarwal R., Varma I.K., *Polym. Commun.*, **26**, 346 (1985)
- [21] Varma D.S., Agarwal R., Varma I.K., *Polym. Mater. Sci. & Engg.*, **53**, 689 (1985)
- [22] Varma I.K., Negi Y.S., Varma D.S., *J. Polym. Mater.*, **3**, 197 (1986)
- [23] Varma D.S., Negi Y.S., Choudhary V., Varma I.K., *Ind. J. Text Res.*, **11**, 173
- [24] Witt U., Muller R.J., Augusta J., Widdecke H., Deckwer W.D., *Macromol. Chem. Phys.*, **195**, 793 (1994)
- [25] Jun H.S., Kim B.O., Kim Y.C., Chang H.N., Woo S.I., *J. Environ. Polym. Degrad.*, **2**, 9 (1994)
- [26] Witt U., Muller R.J., Deckwer W.D., *J. Environ. Polym. Degrad.*, **3**, 215 (1995)
- [27] Albertsson A.C., Ljungquist O., *J. Macromol. Sci. Chem.*, **A23**, 393 (1986)
- [28] Wang H.H., Chen J.C., *Polym. Eng. Sci.*, **35**, 1468 (1995)
- [29] Ranucci E., Liu Y., Söderqvist Lindblad M., Albertsson A.C., *Macromol. Rapid Commun.*, **21**, 680 (2000).
- [30] Deckwer W.D., *FEMS Microbiol. Rev.*, **16**, 143 (1995)
- [31] Nghiem N.P., Davison B.H., Suttle B.E., Richardson G.R. *Appl. Biotech.*, **63**, 65 (1997)
- [32] Lee P.C., Lee W.G., Lee S.Y., Chang H.N., *Process Biochem.*, **35**, 49 (1999)
- [33] Carothers W.H., Dorough G.L., van Natta F.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **54**, 761 (1932)

- [34] van Natta F.J., Hill J.W., Carothers W.H., *J. Am Chem. Soc.*, **56**, 455 (1934)
- [35] Hill J.W., *J. Am Chem. Soc.*, **52**, 4110 (1930)
- [36] Carothers W.H., van Natta F.J., *J. Am Chem. Soc.*, **52**, 314 (1930)
- [37] Duda A., Penczek S., *Macromolecules*, **27**, 4867 (1994)
- [38] Kricheldorf H.R., Kreiser-Saunders I., Boettcher C., *Polymer*, **36**, 1253 (1995)
- [39] Degée P., Dubois P., Jérôme R., *Macromol. Chem. Phys.*, **198**, 1985 (1997)
- [40] Pitt C., Gu Z.W., *J. Controlled Release*, **4**, 283 (1987)
- [41] Jérôme R., Henriouille-Granville M., Boutevin B., Robin J.J., *Prog. Polym. Sci.*, **16**, 837 (1991)
- [42] Sosnowski S., Gadzinowski M., Slomkowski S., *Macromolecules*, **29**, 4556 (1991)
- [43] Gadzinowski M., Sosnowski S., Slomkowski S., *Macromolecules*, **29**, 6404 (1996)
- [44] Brode G.L., Koleske J.V., *J. Macromol. Sci-Chem.* A6(6), 1109 (1972)
- [45] Johns D.B., Lenz R.W., Luecke A., Lactones in: Ivin K.J., Saegusa T. (eds), Ring Opening Polymerization. *Elsevier, London*, **1**, 464 (1984)
- [46] Löfgren A., Albertsson A.C., Dubois P., Jérôme R., *J. Macromol. Sci. Revs. Macromol. Chem. Phys.*, C35(3), 379 (1995)
- [47] Mecerreyes D., Jérôme R., Dubois P., *Adv. Polym. Sci.*, **147**, 1 (1999)
- [48] Kricheldorf H.R., Kreiser-Saunders I., *Macromol. Symp.*, **103**, 85 (1996)
- [49] Saegusa T., Kobayashi S., Hayashi K., *Macromolecules*, **11**, 360 (1978)
- [50] Cherdron H., Ohse H., Korte F., *Makromol Chem.*, **56**, 179 (1962)
- [51] Albertsson A.C., Palmgren R., *J. Macromol. Chem., Pure Appl. Chem.* A33(6), 747 (1996)
- [52] Rozenberg B.A., *Makromol Chem., Macromol. Symp.*, **60**, 177 (1992)

- [53] Penczek S., *J. Polym. Sci., Polym. Chem.*, **38**, 1919 (2000)
- [54] Kubisa P., Penczek S., *Prog Polym Sci.*, **24**, 1409 (1999)
- [55] Jérôme R., Teyssié P., in: Eastmond G.C., Ledwith A., Russo S., Sigwalt P., (eds), *Comprehensive polymer science*, **3(1)**, 501 (1989)
- [56] Penczek S., Slomkowski S., Progress in anionic ring-opening polymerization. In: Hogen-Esch T., Smid J., (eds), Recent advance in anionic polymerization. *Elsevier*, New York, Chap **19**, 275 (1987)
- [57] Jedlinski Z., Kurcok P., Kowalczyk M., *Macromolecules*, **18**, 2679 (1985)
- [58] Hofman A., Slomkowski S., Penczek S., *Makromol. Chem.*, **185**, 91 (1984)
- [59] Jedlinski Z., Walach W., Kurcok P., Adamus G., *Makromol. Chem.*, **192**, 2051 (1991)
- [60] Lundberg R.D., Cox E.F., Lactones. In: Frish K., Reegen S., (eds). Ring-Opening Polymerization. *Marcel Dekker*, New York, **2**, 247 (1969)
- [61] Spassky N., Wisniewski M., Pluta C., Le Borgne A., *Macromol. Chem. Phys.*, **197**, 2627 (1996)
- [62] Ovitt T.M., Coates G.W., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 4072 (1999)
- [63] Kricheldorf H.R., Bers M., Scharnagl N., *Macromolecules*, **21**, 286 (1988)
- [64] Kafrawy A., Mattei F.V., Shalaby S.W., US Patent 4 470 416 (1984)
- [65] Grijpma D.W., Pennings A.J., *Polym. Bull.*, **25**, 335 (1991)
- [66] Dahlmann J., Rafler G., Fechner K., Mehlis B., *Brit. Polym. J.*, **23**, 235 (1990)
- [67] Grijpma D.W., Zondervan G.J., Pennings A.J., *Polym. Bull.*, **25**, 237 (1991)
- [68] Kricheldorf H.R., Meier-Haack J., *Macromol. Chem.*, **194**, 715 (1993)
- [69] Löfgren A., Albertsson A.C., *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, **A32(1)**, 41 (1995)
- [70] Albertsson A.C., Gruvegård M., *Polymer*, **36**, 1009 (1995)

- [71] Kowalski A., Duda A., Penczek S., *Macromol. Rapid Commun.*, **19**, 567 (1998)
- [72] Schwach G., Coudane J., Engel R., Vert M., *J. Polym. Chem.*, **35**, 3431 (1997)
- [73] Kowalski A., Duda A., Penczek S., *Macromolecules*, **33**, 689 (2000)
- [74] Kowalski A., Duda A., Penczek S., *Macromolecules*, **33**, 7359 (2000)
- [75] Kricheldorf H.R., Kreiser-Saunders I., Stricker A., *Macromolecules*, **33**, 702 (2000)
- [76] Ryner M., Stridsberg K., Albertsson A.C., von Schenck H., Svensson M., *Macromolecules*, **34**, 3877 (2001)
- [77] Dubois P., Lacobs C., Jérôme R., Teyssié P., *Macromolecules*, **24**, 2266 (1991)
- [78] Bero M., Czapla B., Dobrzynski P., Janeczek H., Kasperczyk I., *J. Macromol. Chem. Phys.*, **200**, 911 (1999)
- [79] Duda A., Florjanczyk Z., Hofmann A., Slomkowski S., Penczek S., *Macromolecules*, **23**, 1640 (1990)
- [80] Kowalski A., Duda A., Penczek S., *Macromolecules*, **31**, 2114 (1998)
- [81] Gilding D.K., Reed A.M., *Polymer*, **20**, 1459 (1979)
- [82] Dubois P., Ropson N., Jérôme R., Teyssié P., *Macromolecules*, **29**, 1965 (1996)
- [83] Kricheldorf H.R., Berl M., Scharnagl N., *Macromolecules*, **31**, 286 (1988)
- [84] In't Veld P.J.A., Velner E.M., van de Witte P., Hamhuis J., Dijkstra P.J., Keijen J., *J. Polym. Sci. A polym. Chem.*, **35**, 219 (1997)
- [85] Horta Zubiaga A., In: *Macromoléculas, UNED* (eds), 1 (1991)
- [86] Lang M., Wong R.P., Chu C.C., *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **40**, 1127 (2002)
- [87] Lang M., Chu C.C., *J. Appl. Polym. Sci.* **86**, 2296 (2002)

- [88] Burdick J.A., Philpott L.M., Anseth K.S., *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **39**, 683 (2001)
- [89] Storey R.F., Wiggins J.S., Mauritz K.A., Puckett A.D., *Polymer Composites*, **14**, 7 (1993)
- [90] Han Y.K., Edelman P.G., Huang S.J., *J. Macromol. Sci.*, **A25**, 847 (1988)
- [91] Turunen M.P.K., Korhonen H., Tuominen J., Seppälä J.V., *Polym. Int.*, **51**, 92 (2001)
- [92] Tuominen J., Kylmä J., Seppälä J., Selin, J.F., WO 03/033563 (2001)
- [93] Sawhney A.S., Pathak C.P., Hubbell J.A., *Macromolecules*, **26**, 581 (1993)
- [94] Storey R.F., Warren S.C., Allison C.J., Wiggins J.S., Puckett A.D., *Polymer*, **34**, 4365 (1993)
- [95] Storey R.F., Warren S.C., Allison C.J., Puckett A.D., *Polymer*, **38**, 6295 (1997)
- [96] Davis K.A., Burdick J.A., Anseth K.S., *Biomaterials*, **24**, 2485 (2003)
- [97] Aoyagi T., Miyata F., Nagase Y., *J. Controlled Release*, **32**, 87 (1994)
- [98] Mizutani M., Matsuda T., *J. Biomed. Mater. Res.*, **62**, 387 (2002)
- [99] Coullerez G., Lowe C., Pechy P., Kausch H.H., Hilborn, J., *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **11**, 505 (2000)
- [100] John G., Morita M., *Macromolecules*, **32**, 1853 (1999)
- [101] Elisseff J., Anseth K.S., Langer R., Hrkach J.S., *Macromolecules*, **30**, 2182 (1997)
- [102] Vainionpää S., Rokkanen P., Törmälä R., *Prog. Polym. Sci.*, **14**, 679 (1989)
- [103] Göpferich A., *Biomaterials*, **17**, 103 (1996)
- [104] Mayer J., Kaplan D., *Trends Polym. Sci.*, **2**, 227 (1994)
- [105] Albertsson A.C., Lundmark S., *Brit. Polym. J.*, **23**, 205 (1990)
- [106] Heller J., Sparer R., Zentner G., *Biodegrad. Polym.*, **45**, 121 (1990)

- [107] Albertsson A.C., Eklund M., *J. Appl. Polym. Sci.*, **57**, 87 (1995)
- [108] Leenslag J.W., Pennings A.J., *Macromol. Chem.*, **188**, 1809 (1987)
- [109] Jamshidi K., Hyon S.H., Ikada Y., *Polymer*, **29**, 2229 (1988)
- [110] Kalb B., Pennings A.J., *Polymer*, **21**, 607 (1980)
- [111] Kulkarni R.K., Pani K.C., Neuman C., Leonard F., *Arch. Surg.*, **93**, 839 (1966)
- [112] Brode G.L., Koleske J.V., *J Macromol Sci Chem* **A6** (6), 1109 (1972)
- [113] Albertsson A.C., Varma I.K., *Advance in Polymer Science* **157**, 1 (2002)
- [114] Pitt C.G., Gratzl M.M., Kimmel G.L. Surles J., Schindler A., *Biomaterials*, **2**, 215 (1981)
- [115] Hiltunen K., Seppälä J., Härkönen M., *J. Appl. Polym. Sci.*, **64**, 865 (1997)
- [116] Pitt C.G., Chasalow F.I., Hibionada Y.M., Klimas D.M., Schindler A., *J. Appl. Polym. Sci.*, **26**, 3779 (1981)
- [117] Engelberg I., Kohn J., *Biomaterials*, **12**, 292 (1991)
- [118] Ali S.A.M., Zhong S.P., Doherty P.J., Williams D.F., *Biomaterials*, **14**, 648 (1993)
- [119] Edlund U., Albertsson A.C., *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, **38**, 786 (2000)
- [120] Ajji A., Renand M.C., *J. Appl. Polym. Sci.*, **26**, 3917 (1991)
- [121] Chiu S.C., Smith T.G., *J. Appl. Polym. Sci.*, **29**, 1797 (1984)
- [122] Edlund U., Albertsson A.C., *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, **37**, 1877 (1999)
- [123] Edlund U., Albertsson A.C., *J. Bioact. Compat. Polym.*, **15**, 1 (2000)
- [124] Ikada Y., Tsuji H., *Macromol. Rapid. Común.*, **3**, 117 (2000)
- [125] Langer R., Vacanti J.P., *Science*, **260**, 920 (1993)
- [126] Salgado J.A., Coutinho O.P., Reis R.L., *Macromolecules Bioscience*, **4(8)**, 743 (2004)

- [127] Kneser U., Schaefer D. J., Munder B., Klemt C., Andree C., Stark G. B., *Min. Invas. Ther. Allied Technol.*, **11**, 107 (2002)
- [128] Yaszemski, M.J., Oldham J.B., Lu L., Currier B.L., “*Bone Engineering*”, 1st Em squared (eds), Toronto, 541 (1994)
- [129] Spitzer R., Perka C., Lindenhayn K., Zippel H., *J. Biomed. Mater. Res.*, **59**, 690 (2002)
- [130] Simon G.C., Khatri C.A., Wight S.A, Wang F.W., *J. Orthop. Res.*, **20**, 473 (2002)
- [131] Rose F.R., Oreffo R.O., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **292**, 1 (2002)
- [132] Petite H., Viateau V., Bensaid W., Meunier A., Pollak C., Bourguignon M., Oudina K., Sedel L., Guillemin G., *Nature Biotech.*, **18**, 959 (2000)
- [133] Asahina I., Seto I., Oda M., Marukawa E., Imranul A.M., Enomoto S., “*Bone Engineering*”, 1st Em squared (eds), Toronto, 526 (1999)
- [134] Reece G.P., Patrick C.W., Jr., “*Frontiers in Tissue Engineering*”, 1st (eds), Pergamon, Oxford, 166 (1998)
- [135] Williams D.F., “*Bone Engineering*”, 1st Em squared (eds), Toronto, 577 (1999)
- [136] Hutmacher D.W., *Biomaterials*, **21**, 2259 (2000)
- [137] Agrawal C.M., Ray R.B., *J. Biomed. Mater. Res.*, **55**, 141 (2001)
- [138] Leong K.F., Cheah C.M., Chua C.K., *Biomaterials*, **24**, 3262 (2003)
- [139] Yang S., Leong K.F., Du Z., Chua C.K., *Tissue Eng.*, **7**, 679 (2001)
- [140] Freed L.E., VunjakNovakovic G., *Adv. Drug. Delivery Rev.*, **33**, 15 (1998)
- [141] Burg K.J., Porter S., Kellam J.F., *Biomaterials*, **21**, 2347 (2000)
- [142] Holly C.E., Schoichet M.S., Davies J.E., *J. Biomed. Mater. Res.*, **51**, 376 (2000)
- [143] Lange R., Luthen F., Beck U., Rychly J., Baumann A., Nebe B., *Biomol. Eng.*, **19**, 255 (2002)

- [144] He W., Gonsalves K.E., Batina N., Poker D.B., Alexander E., Hudson M., *Biomed. Dev.*, **5**, 101 (2003)
- [145] Cassineli C., Morra M., Bruzzone G., Carpi A., Di Santi G., Giardino R., Fini M., *Int. J. Oral Maxillofac. Impl.*, **18**, 46 (2003)
- [146] Davies J.E., *Int. J. Prosthodont.*, **11**, 391 (1998)
- [147] Albrektsson T., Johansson C., *Eur. Spine J.*, **10**, S96 (2001)
- [148] Gomes M.E., Salgado A.J., Reis R.L., *“ Polymer Based Systems on Tissue Engineering, Replacement and Regeneration”*, 1st (eds), Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 221 (2002)
- [149] Deporter D.A., Komori N., Howley T.P., Shiga A., Ghent A., Hensel P., Parisien K., *Calcif. Tissue Int.*, **42**, 321 (1988)
- [150] Murata M., Huang B.Z., Shibata T., Imai S., Nagai N., Arisue M., *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, **28**, 232 (1999)
- [151] Ueda H., Hong L., Yamamoto M., Shigeno K., Inoue M., Toba T., Yoshitani M., Nakamura T., Tabata Y., Shimizu Y., *Biomaterials*, **23**, 1003 (2002)
- [152] Sachlos E., Reis N., Ainsley C., Derby B., Czernuszka J.T., *Biomaterials*, **24**, 1487 (2003)
- [153] Haisch A., Loch A., David J., Pruss A., Hansen R., Sittinger M., *Med. Biol. Eng. Comp.*, **38**, 686 (2000)
- [154] Tayapongsak P., O'Brien D.A., Monteiro C.B., Arceo-Diaz L.Y., *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **52**, 161 (1994)
- [155] Hojo M., Inokuchi S., Kidokoro M., Fukuyama N., Tanaka E., Tsuji C., Myasaka M., Tanino R., Nakazawa H., *Plast. Reconstr. Surg.*, **111**, 1638 (2003)
- [156] Senior R.M., Skogen W.F., Griffin G.L, Wilner G.D., *J. Clin. Invest.*, **77**, 1014 (1986)

- [157] Salgado A.J., Gomes M.E., Chou A., Coutinho O.P., Reis R.L., Hutmacher D.W., *Mater. Sci. Eng. C*, **20**, 27 (2002)
- [158] Endres M., Schantz J.T., Salgado A.J., Kaps C., Ringe J., Lim T.C., Reis R.L., Sittinger M., Hutmacher D.W., *Tissue Eng.*, **9**, 689 (2003)
- [159] Huang Q., Goh J.C., Hutmacher D.W., Lee E.H., *Tissue Eng.*, **8**, 469 (2002)
- [160] Shmelzeisen R., Schimming R., Sittinger M., *J. Craniomaxillofac. Surg.*, **31**, 34 (2003)
- [161] Zhang M., Haga A., Sekiguchi H., Hirano S., *Int. J. Biol. Macromol.*, **27**, 99 (2000)
- [162] Tolaimate A., Desbrieres J., Rhazi M., Alagui A., *Polymer*, **44**, 7939 (2003)
- [163] Zhao F., Yin Y., Lu W.W., Leong J.C., Zhang W., Zhang J., Zhang M., Yao K., *Biomaterials*, **23**, 3227 (2002)
- [164] Rezanian A., Healy K.E., *J. Biomed. Mater. Res.*, **52**, 595 (2000)
- [165] Park Y.J., Lee Y.M., Park S.N., Sheen S.Y., Chung C.P., Lee S.J., *Biomaterials*, **21**, 153 (2000)
- [166] Lee Y.M., Park Y.J., Lee S.J., Ku Y., Han S.B., Choi S.M., Klokkevold P.R., Chung C.P., *J. Periodontol.*, **71**, 410 (2000)
- [167] Zhang Y., Ni M., Zhang M., Ratner B., *Tissue Eng.*, **9**, 337 (2003)
- [168] Baran E.T., Tuzlagoklu K., Salgado A.J., Reis R.L., *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **15**, 161 (2004)
- [169] Reis R.L., Cunha A.M., "Biological and Biomimetic Materials", In: *Encyclopedia of Materials Science and Technology*, Buschow K.H.J., Cahn R.W., Flemings M.C., Ilshner B., Kramer E.J., Mahajan S., (Eds.), Pergamon, Elsevier Science, Amsterdam, 8810 (2001)
- [170] Reis R.L., Cunha A.M., *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **6**, 786 (1995)

- [171] Pereira C.S., Cunha A.M., Reis R.L., Vasquez B., San Roman J., *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **9**, 825 (1998)
- [172] Sousa R.A., Kalay G., Reis R.L., Cunha A.M., Bevis M.J., *J. Appl. Polym. Sci.*, **77**, 1303 (2000)
- [173] Gomes M.E., Ribeiro A.S, Malafaya P.B., Reis R.L., Cunha A.M., *Biomaterials*, **22**, 883 (2001)
- [174] Gomes M.E., Reis R.L., Cunha A.M., van Blitterswijk C.A., de Bruijn J.D., *Biomaterials*, **22**, 1991 (2001)
- [175] Mendes S.C., Reis R.L., Bovell Y.P., Cunha A.M., van Blitterswijk C.A., de Bruijn J.D., *Biomaterials*, **22**, 2014 (2001)
- [176] Marques A.P., Reis R.L., Hunt J.A., *Biomaterials*, **23**, 1471 (2002)
- [177] Malafaya P.B., Elvira C., Gallardo A., San Roman J., Reis R.L., *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **12**, 1227 (2001)
- [178] Elvira C., Mano J.F., San Roman J., Reis R.L., *Biomaterials*, **23**, 1955 (2002)
- [179] Espigares I., Elvira C., Mano J.F., Vasquez B., San Roman J., Reis R.L., *Biomaterials*, **23**, 1883 (2002)
- [180] Boesel L.F., Mano J.F., Reis R.L., *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **15**, 73 (2004)
- [181] Gomes M.E., Godinho J.S., Tchalamov D., Reis R.L., Cunha A.M., *Mater. Sci. Eng. C.*, **20**, 19 (2002)
- [182] Salgado A.J., Coutinho O.P., Reis R.L., *Tissue Eng.*, **10**, 465 (2004)
- [183] Brekke J.H., Toth J.M., *J. Biomed. Mater. Res.*, **43**, 380 (1998)
- [184] Liu L.S., Thompson A.Y., Heidaran M.A., Poser J.W., Spiro R.C., *Biomaterials*, **20**, 1097 (1999)
- [185] Solchaga L.A., Dennis J.E., Goldberg V.M., Caplan A.I., *J. Orthop. Res.*, **17**, 205 (1999)

- [186] Kostopoulos L., Karring T., *Clin. Oral Implants Res.*, **5**, 75 (1994)
- [187] Chen L.J., Wang M., *Biomaterials*, **23**, 2631 (2002)
- [188] Mikos A.G., Thorsen A.J., Czerwonka L.A., Bao Y., Langer R., Winslow D.N., Vacanti J.P., *Polymer*, **35**, 1068 (1994)
- [189] Mooney D.J., Baldwin D.F., Suh N.P., Vacanti J.P., Langer R., *Biomaterials*, **17**, 1417 (1996)
- [190] IshaughRiley S.L., Crane G.M., Gurlek A., Miller M.J., Yasko A.W., Yaszemski M.J., Mikos A.G., *J. Biomed. Mater. Res.*, **36**, 1 (1997)
- [191] Malekzadeh R., Hollinger J.O., Buck D., Adams D.F., McAllister B.S., *J. Periodontol.*, **69**, 1256 (1998)
- [192] Thomson R.C., Mikos A.G., Beham E., Lemon J.C., Satterfield W.C., Aufdemorte T.B., Miller M.J., *Biomaterials*, **20**, 2007 (1999)
- [193] Murphy W.L., Khon D.H., Mooney D.J., *J. Biomed. Mater. Res.*, **50**, 50 (2000)
- [194] Ma P.X., Choi J.W., *Tissue Eng.*, **7**, 23 (2001)
- [195] Yoon J.J., Park T.G., *J. Biomed. Mater. Res.*, **55**, 401 (2001)
- [196] Saito N., Okada T., Horiuchi H., Murakami N., Takahashi J., Nawata M., Ota H., Nozaki K., Takaoka K., *Nature Biotechnol.*, **19**, 332 (2001)
- [197] Liao C.J., Chen C.F., Chen J.H., Chiang S.F., Lin Y.J., Chang K.Y., *J. Biomed. Mater. Res.*, **59**, 676 (2002)
- [198] El-Amin S.F., Attawia M., Lu H.H., Shah A.K., Chang R., Hickok N.J., Tuas R.S., Laurencin C.T., *J. Orthop. Res.*, **20**, 20 (2002)
- [199] Choi S.H., Park T.G., *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **13**, 1163 (2002)
- [200] Ochi K., Chen G., Ushida T., Gojo S., Segawa K., Tai H., Ueno K., Ohkawa H., Mori T., Yamaguchi A., Toyama Y., Hata J., Umezawa A., *J. Cell Physiol.*, **194**, 45 (2003)

- [201] Yang X., Tare R.S., Partdrige K.A., Roach H.I., Clarke N.M., Howdle S.M., Shakesff K., Oreffo R.O., *J. Bone. Miner. Res.*, **18**, 47 (2003)
- [202] Abukawa H., Terai H., Hannouche D., Vacanti J.P., Kaban L.B., Troulis M.J., *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **61**, 94 (2003)
- [203] Taboas J.M., Maddox R.D., Krebsbach P.H., Hollister S.J., *Biomaterials*, **24**, 181 (2003)
- [204] Lieb E., Tessmar J., Hacker M., Fischbach C., Rose D., Blunk T., Mikos A.G., Gopferich A., Shulz M.B., *Tissue Eng.*, **9**, 71 (2003)
- [205] Almin S.F., Lu H.H., Khan Y., Burems J., Mitchell J., Tuan R.S., Laurencin C.T., *Biomaterials*, **24**, 1213 (2003)
- [206] Luu Y.K., Kim K., Hsiao B.S., Chu B., Hadjiargyrou M., *J. Controlled Release*, **89**, 341 (2003)
- [207] Wang Y.C., Lin M.C., Wang M., Hsieh H.J., *Biomaterials*, **24**, 1047 (2003)
- [208] Vozzi G., Flaim C., Ahluwalia A., Bhatia S., *Biomaterials*, **24**, 2533 (2003)
- [209] Behravesh E., Yasko A., Engel P., Mikos A.G., *Clin. Orthop.*, **367S**, S118 (1999)
- [210] Thordarson D.B., Hurvitz G., *Foot Ankle Int.*, **23**, 1003 (2002)
- [211] Peltoniemi H., Ashammakhi N., Kontio R., Waris T., Salo A., Lindqvist C., Gratz K., Suuronen R., *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. & Endodont.*, **94**, 5 (2002)
- [212] Hutmacher D.W., Schantz J.T., Zein I., Ng K.W., Teoh S.H., Tan K.C., *J. Biomed. Mater. Res.*, **55**, 203 (2001)
- [213] Washburn N.R., Simon C.G., Jr., Tona A., Elgendy H.M., Karim A., Amis E.J., *J. Biomed. Mater. Res.*, **60**, 20 (2002)

- [214] Shantz J.T., Hutmacher D.W., Ng K.W., Khor H.L., Lim T.C., Teoh S.H., *Int. J. Oral Maxillof. Implant.*, **17**, 161 (2002)
- [215] Schantz J.T., Hutmacher D.W., Chim H., Ng K.W., Lim T.C., Teoh S.H., *Cell Transplant.*, **11**, 125 (2002)
- [216] Zein I., Hutmacher D.W., Tan K.C., Teoh S.H., *Biomaterials*, **23**, 1169 (2002)
- [217] Kweon H., Yoo M.K., Park I.K., Lim T.H., Lee H.C., Lee H.S., Oh J.S., Akaike T., Chi C.S., *Biomaterials*, **24**, 801 (2003)
- [218] Shun A.K., Timmer M.D., Jo S., Engel P.S., Mikos A.G., *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **13**, 95 (2002)
- [219] He S., Timmer M.D., Yaszemski M.J., Yasko A.W., Engel P.S., Mikos A.G., *Polymer*, **42**, 1251 (2001)
- [220] He S., Yaszemski M.J., Yasko A.W., Engel P.S., Mikos A.G., *Biomaterials*, **21**, 2389 (2000)
- [221] Behravesh E., Jo S., Zygourakis K., Mikos A.G., *Biomacromolecules*, **3**, 374 (2002)
- [222] Tanahashi K., Mikos A.G., *J. Biomed. Mater. Res.*, **62**, 558 (2002)
- [223] Shung A.K., Behravesh E., Jo S., Mikos A.G., *Tissue Eng.*, **9**, 243 (2003)
- [224] Sim H., Temenoff J.S., Mikos A.G., *Biomacromolecules*, **4**, 552 (2003)
- [225] Sin H., Quinten Ruhe P., Mikos A.G., Jansen J.A., *Biomaterials*, **24**, 3201 (2003)
- [226] Khon J., Langer R., *Biomaterials*, **7**, 176 (1986)
- [227] Li C., Khon J., *Macromolecules*, **22**, 2029 (1989)
- [228] Pulapuram S., Li C., Khon J., *Biomaterials*, **11**, 666 (1990)
- [229] Ertel S.I., Khon J., Zimmerman M.C., Passos J.R., *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**, 1337 (1995)

- [230] Ibim S.E., Ambrosio A.M.A., Kwon M.S., El-Amin S.F., Allcock H.R., Laurencin C.T., *Biomaterials*, **18**, 1565 (1997)
- [231] Laurencin C.T., El-Amin S.F., Ibim S.E., Willoghby D.A., Attawia M., Allcock H.R., Ambrosio A.M.A., *J. Biomed. Mater. Res.*, **30**, 133 (1996)
- [232] Ibim S.E., Uhrich K.E., Attawia M., Shastri V.R., El-Amin S.F., Bronson R., Langer R., Laurencin C.T., *J. Biomed. Mater. Res.*, **43**, 374 (1998)
- [233] Uhrich K.E., Ibim S.E., Larrier D.R., Langer R., Laurencin C.T., *Biomaterials*, **19**, 2045 (1998)
- [234] Baron R., Anatomy and biology of bone matrix and cellular elements. Chapter 1. *American society for bone and mineral research*, Washington DC, 1, (2003)
- [235] <http://www.zonamedica.com.ar/categorias/medicinailustrada/osteoporosis/estructura.htm>
- [236] Robey P.G., Boskey A.L., Anatomy and biology of bone matrix and cellular elements. Chapter 6. *American society for bone and mineral research*, Washington DC, 38, (2003)
- [237] Rossert J., Terraz C., Dupont S., *Nephrol. Dial. Transplant.*, **15**, 66 (2000)
- [238] Tohme J.F., Seibel M.J., Silverberg S.J., Robins S.P., Bilezikian J.P., *Rheumatol.*, **50**, 133 (1991)
- [239] Gundberg C.M., Clough M.E., *J. Bone Miner. Res.*, **7**, 73 (1992)
- [240] Garner P., Grimaux M., Seguin P., Delmas P.D., *J. Bone Miner. Res.*, **9**, 255 (1994)
- [241] Masi L., Brandi M.L., *Q. J. Nucl. Med.*, **45**, 2 (2001)
- [242] Harada S., Rodan G.A., *Nature*, **423**, 349 (2003)
- [243] Manolagas S.C., *Bone*, **17**, 63 (1995)
- [244] Yang X., Karsenty G., *Trends Mol. Med.*, **8**, 340 (2002)

- [245] Mundy G.R., *Osteoporos Int.*, **1**, 126 (1993)
- [246] Nieto Charques L., Moratal Pérez D., Martí Bonmatí L., EsTra: Análisis de la Estructura Trabecular. Herramienta de ayuda al diagnóstico de enfermedades óseas basada en un análisis estructural tridimensional a partir de imágenes de resonancia magnética. Herramienta-software registrada en el Centro de Transferencia Tecnológica de la Universidad Politécnica de Valencia, (2006)
- [247] Nieto Charques L., Proyecto Fin de Carrera titulado "EsTra: Análisis de la Estructura Trabecular. Herramienta de ayuda al diagnóstico de enfermedades óseas basada en un análisis estructural tridimensional a partir de imágenes de resonancia magnética". Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Telecomunicación, Universidad Politécnica de Valencia, (2006).
- [248] Alberich Bayarri A., Proyecto Fin de Carrera titulado "Análisis estructural y mecánico mediante elementos finitos de la microarquitectura trabecular a partir de imágenes de resonancia magnética de alta resolución para una ayuda al diagnóstico, tratamiento y prevención de la osteoporosis. Aplicación del análisis estructural y mecánico a andamiajes sustitutivos de biopolímeros de hueso trabecular". Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Telecomunicación, Universidad Politécnica de Valencia, (2007).
- [249] Gordon M., Taylor J.S., *J. Appl. Chem.*, **2**, 493 (1952)
- [250] Crank J., Park G.S., *Diffusion in Polymers*. London: Academic Press (1968)
- [251] Gómez J.L., Monleón M., Gallego G., Peydró N., Pérez V., Pissis P., Kyritsis A., *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.*, **37**, 1587 (1999)
- [252] Serrano Aroca A., Campillo Fernandez A.J., Gomez Ribelles J.L., Monleón Pradas M., Gallego Ferrer G., Pissis P., *Polymer*, **45**, 8949 (2004)

- [253] Gallego Ferrer G., Monleón Pradas M., Gomez Ribelles J.L., Pissis P., *J. Non-Cryst. Solids*, **235**, 692 (1998)
- [254] Brígido Diego R., Pérez Olmedilla M., Serrano Aroca A., Gómez Ribelles J.L., Monleón Pradas M., Gallego Ferrer G., Salmerón Sánchez M., *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **16**, 693 (2005)
- [255] Gibson L.J., *Biomechanics*, **38**, 377 (2005)
- [256] Hutmacher D.W., *Biomaterials*, **21**, 2529 (2000)
- [257] Gibson L.J., Ashby M.F. Cellular solids. Structure and properties. Second Edition, Chapter 5, Cambridge University Press (1997)
- [258] Chirila T.V., Chen Y.C., Griffin B.J., *Polym. Int.*; **32**, 221 (1993)
- [259] Clayton A.B., Chirila T.V., Dalton P.D., *Polym. Int.*; **42**, 45 (1997)
- [260] Vijayasekaran S., Fitton J.H., Hicks C.R., Chirila T.V., Crawford G.J., Constable I.J., *Biomaterials*; **19**, 2255 (1998)
- [261] Ziegelaar B.W., Fitton J.H., Clayton A.B., Platten S.T., Maley M.A.L., Chirila T.V., *Biomaterials*, **20**, 1979 (1999)
- [262] Pérez Olmedilla M., Garcia-Giralt N., Monleón Pradas M., Benito Ruiz P., Gómez Ribelles J.L., Cáeres Palou E., Monllau García J.C., *Biomaterials*, **27**, 1003 (2006)
- [263] Diebold Y., Calonge M., Enríquez de Salamanca A., Callejo S., Corrales R. M., Saez V., Siemasko K.F., Stern M.E., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*; **44**, 4263 (2003).
- [264] Soria J.M., Martínez Ramos C., Bahamonde O., García Cruz D.M., Salmerón Sánchez M., García Esparza M.A., Casas C., Guzmán M., Navarro X., Gómez Ribelles J.L., García Verdugo J.M., Monleón Pradas M., Barcia J.A., *J Biomed Mater Res Part A*; **83A**, 463 (2007)
- [265] Keselowsky B.G., Collard D.M., García A.J., *J.Biomed. Mater. Res.*, **66A**, 247 (2003)

- [266] Rodríguez Hernández J.C., Salmerón Sánchez M., Soria J.M., Gómez Ribelles J.L., Monleón Pradas M., *Biophysical Journal*, **93**, 202 (2007)
- [267] Gerstenfeld L.C., Chipman S.D., Kelly C.M., Hodgens K.J., Lee D.D., *J. Cell Biol.*, **106**, 979 (1988).
- [268] Coelho M.J., Cabral A.T., Fernande M.H., *Biomaterials*, **21**,1087 (2000)
- [269] Pockwinse S.M., Wilming L.G., Conlon D.M., Stein G.S., Lian J.B., *J. Cell. Biochem.*, **49**, 310 (1992).
- [270] Röttele A., Turn-Albretch T., Sommer J.U., Reiter G., *Macromolecules*, **36**, 1257 (2003)
- [271] Flory P.J., "Principles of Polymer Chemistry", Cornell University Press, Ithaca, NY (2003)
- [272] Mark J., *Rubber Chem. Technol.*, **55**, 762 (1982)
- [273] Gómez Ribelles J.L., Meseguer Dueñas J.M., Monleón Pradas M., *Polymer*, **29**, 1124 (1988)
- [274] Kharas G.B., Kamenetsky M., Simantirakis J, Beinlich K.C., Rizzo A.M.T., Caywood, G.A., Watson K., *J Appl Polym Sci.*, **66**, 1123 (1997)
- [275] Peter S.J., Kim P., Yasko A.W., Yaszemski M.J., Mikos A.G., *J. Biomed. Mater. Res.*, **44**, 314 (1999)
- [276] Domb A.J., Manor N., Elmalak O., *Biomaterials*, **17**, 411 (1996)
- [277] Kim B.S., Hrkach J.S., Langer R., *J Polym Sci Part A: Polym Chem.*, **38**, 1277 (2000)
- [278] Salmerón Sánchez M., Gómez Ribelles J.L., Hernández Sánchez F., Mano J.F., *Thermochim Acta*, **430**, 201 (2005)