



Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

**“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE
POLIURETANOS BIODEGRADABLES TIOLADOS”**

Tesis que presenta

LERMA HANAIY CHAN CHAN

En opción al título de

MAESTRO EN MATERIALES POLIMÉRICOS

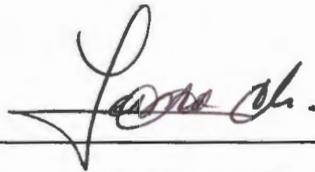
Mérida, Yucatán, México.
Febrero, 2008



DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento, proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó, para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., y que dicha información le pertenece en los términos de la Ley de la Propiedad Industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Mérida, Yucatán, a 22 de febrero de 2008



Lerma Hanaiy Chan Chan

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LA UNIDAD DE MATERIALES DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN A.C., BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. JUAN VALERIO CAUICH RODRÍGUEZ.

Dedicatorias

A **Jehová** mi Dios, por que en este trabajo he aprendido más sobre el maravilloso diseño de nuestro cuerpo (Salmos 139:14).

A mis hijos **David** y **Hania**, dos motores en mi vida.

A mi padres **M^a Reyes** y **Antonio**, por todo su apoyo.

A mis hermanos, sobrinos y amigos, por todo su cariño.

Agradecimientos

- ❖ A mi asesor, Dr. Juan V. Cauich Rodríguez, por todo su apoyo, paciencia y ayuda proporcionados durante la realización de esta tesis.
- ❖ A mis coasesores, Dr. Manuel Aguilar Vega y Dr. Antonio Martínez Richa, por sus consejos y conocimientos que enriquecieron este trabajo.
- ❖ A mi honorable comité revisor, Dr. Manuel Cervantes Uc y Dr. Raúl Solís Correa por sus valiosas observaciones y comentarios realizados al trabajo.
- ❖ Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) y en especial a la unidad de Materiales, por proporcionar las facilidades para desarrollar el proyecto.
- ❖ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca No. 199867 otorgada para la realización de mis estudios de maestría.
- ❖ A la Q. I. Rossana Vargas Coronado, por su colaboración en la obtención de las micrografías en el MEB y todo su apoyo prestado en la realización de esta tesis.

- ❖ A la Dr. Patricia Quintana Owen, por su colaboración en la obtención de los espectros de DRX.
- ❖ A todos mis compañeros del CICY por su compañía y apoyo.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABLAS	ix
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
HIPÓTESIS	6
OBJETIVOS	7
CAPÍTULO I. ASPECTOS TEÓRICOS	8
1.1. Poliuretanos segmentados (SPUs por sus siglas en inglés)	8
1.1.1. Aspectos históricos	8
1.1.2. Aplicaciones en el campo médico	8
1.1.3. Características de los SPUs	9
1.1.3.1. Estructura y composición química.....	9
1.1.3.2. Segmento rígido y segmento flexible	12
1.1.3.3. Separación de fase.....	13
1.1.3.4. Peso molecular y método de síntesis	15
1.1.3.5. Propiedades mecánicas	16
1.2. Biodegradación de poliuretanos.....	18
1.2.1. Influencia del medio ambiente biológico.	18
1.2.2. Mecanismos de degradación	19
1.2.2.1. Degradación hidrolítica.....	19

1.2.2.2. Degradación oxidativa	19
1.2.2.3. Calcificación	20
1.2.2.4. Formación de fisuras por esfuerzos ambientales	20
1.3. Polímeros biodegradables.	21
1.3.1. Ventajas de los biomateriales poliméricos biodegradables.....	22
1.3.2. Síntesis de SPUs biodegradables.....	23
1.3.2.1. Segmentos flexibles biodegradables (Policaprolactona, PCL)	24
1.3.2.2 Segmentos rígidos degradables.	27
1.4. Hemocompatibilidad.....	28
1.4.1. Sistema de coagulación	29
1.4.2. Respuesta de la sangre ante superficies artificiales.....	29
1.4.2.1. Papel de la adsorción de proteínas	30
1.4.2.2. Efectos plaquetarios	31
1.4.2.3. Cascada de coagulación	32
1.4.2.4. Dependencia de la superficie de contacto con la hemocompatibilidad.....	35
1.4.2.5. Modificación superficial para la obtención de superficies no trombogénicas	35
1.4.2.6. Liberación endógena de óxido nítrico	37
CAPÍTULO II. PARTE EXPERIMENTAL	39
2.1. Materiales.....	39
2.2. Preparación de SPUs.....	39
2.3. Caracterización de los poliuretanos	41
2.3.1 Determinación de estructura y composición	41

2.3.1.1. Espectroscopia por Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en ingles) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	41
2.3.2. Caracterización mecánica.....	41
2.3.3. Caracterización térmica.....	42
2.3.3.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	42
2.3.3.2. Análisis dinámico mecánico (DMA)	42
2.3.3.3. Análisis termogravimétrico (TGA).....	42
2.4. Estudios de degradación química <i>in vitro</i>	43
2.4.1. Degradación hidrolítica y oxidativa a temperatura elevada.....	43
2.4.2. Degradación oxidativa con catálisis <i>in vitro</i>	43
2.4.3. Caracterización de los poliuretanos degradados	44
2.5. Modificación superficial de poliuretanos segmentados con L-Cisteína.....	44
2.5.1. Identificación de grupos hidroxilo superficiales	45
2.5.2. Identificación de azufre y grupos tioles	46
2.6. Ensayos de hemocompatibilidad	47
2.6.1. Determinación del tiempo de coagulación con sangre completa (Método de Lee-White)	47
2.6.2. Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa).....	48
2.6.3. Tiempo de protrombina (TP).....	48
2.6.4. Caracterización superficial por MEB de muestras en contacto con sangre y plasma	49
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	50
3.1. Caracterización de los poliuretanos	50
3.1.1. Caracterización espectroscópica.....	50

3.1.1.1. FTIR.....	50
3.1.1.2. ¹ H RMN	53
3.1.2 Caracterización mecánica.....	55
3.1.3. Caracterización térmica.....	56
3.1.3.1. Análisis mecánico dinámico (DMA)	56
3.1.3.2. Análisis Termogravimétrico (TGA)	57
3.1.3.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	58
3.2. Estudios de degradación química <i>in vitro</i>	60
3.2.1. Caracterización de poliuretanos degradados	60
3.2.1.1. Pérdida de masa	60
3.2.1.2 Espectroscopía de IR.....	62
3.2.1.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	65
3.2.1.4 Análisis termogravimétrico (TGA).....	67
3.2.1.5. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	70
3.2.1.6. Difracción de rayos X (DRX)	74
3.3. Degradación oxidativa con catálisis	76
3.3.1. Grado de hinchamiento y degradación oxidativa.....	77
3.3.2. Caracterización mecánica de muestras degradadas por vía oxidativa con catálisis.....	79
3.4. Modificación superficial con L-Cisteína	81
3.4.1. Hidroxilación	82
3.4.2. Injerto de Glutaraldehído.....	84
3.4.3. Injerto de L-cisteína.....	84
3.5. Ensayos de hemocompatibilidad	85
3.5.1. Determinación del tiempo de coagulación con sangre completa	85

3.5.2. Determinación del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) y del Tiempo de protrombina (TP).	88
3.5.3. Caracterización de poliuretanos en contacto con sangre y plasma mediante MEB.....	91
3.5.4.1. Morfología de la superficie de los SPUs en presencia de sangre completa	91
3.5.4.2. Morfología en presencia de plasma (Después del análisis TTPa)	93
3.5.4.3. Morfología en presencia de plasma (Después del análisis TP)	93
IV. CONCLUSIONES.....	96
V. SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS	97
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
APÉNDICE I.....	113
APÉNDICE II.	114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura lineal de un SPU [14].	10
Figura 1.2. Organización de los segmentos rígidos y flexibles en la molécula de SPU [14].	14
Figura 1.3. a) SPU sometido a esfuerzo de tensión. b) Relajación en SPU sometidos a esfuerzo de tensión [14].	17
Figura 1.4. Esquema simplificado de la metabolización de la PCL.	25
Figura 1.5. Estructuras de la α,ω -hidroxi- poli- ϵ -caprolactona, donde R depende del iniciador empleado en la síntesis. Con iniciador, a) monosustituído y b) bisustituído [60].	27
Figura 1.6. Plaquetas activadas agrupadas en un trombocito.	32
Figura 1.7. Diagrama de la cascada de coagulación, donde se observan la ruta extrínseca, intrínseca, común y todos sus cofactores.	34
Figura 1.8. Micrografía coloreada de un trombo producido por los eventos hemostáticos.	35
Figura 1.8. Mecanismo general para la transnitrosación de los tioles.	38
Figura 3.1. Espectros de IR. a) SPUB, b) SPUBSH y c)TECOFLEX®.	50
Figura 3.2. Mecanismos sugeridos para la formación de poliuretanos segmentados utilizando DTE o BDO como extendedores de cadena.	52
Figura 3.3. Espectros de ^1H RMN para los poliuretanos segmentados sintetizados.	54
Figura 3.4. Curvas esfuerzo-deformación de los SPU sintetizados y Tecoflex®	55
Figura 3.5. Efecto de los dos diferentes extendedores de cadena sobre a) Modulo de almacenamiento y b) Tangente delta, en SPUB y SPUBSH.	56

Figura 3.6. Termogramas de TGA de los SPUs sintetizados y del Tecoflex [®] . a) Pérdida de masa y b) Primera derivada	58
Figura 3. 7. Termogramas de DSC para a) SPUB, b) SPUBSH y c) TECOFLEX [®] ; en primer calentamiento (línea continua) y segundo calentamiento (línea punteada).	59
Figura 3.8. Espectros de IR de poliuretanos degradados.....	63
Figura 3.9. Termogramas de DSC para las muestras de SPUs sin degradar y degradadas.....	66
Figura 3.10. Termogramas de TGA del SPUB, SPUBSH y Tecoflex [®] sin degradar y de los residuos de las diferentes degradaciones.....	69
Figura 3.11.- Películas de SPUB sin degradar vista superficial(s) y transversal (t); degradadas en medio: neutro (as y at), oxidativo (bs y bt), ácido (cs, ct) y alcalino (ds y dt).....	71
Figura 3.12.- Películas de SPUBSH sin degradar vista superficial (s) y transversal (t); degradadas en medio: neutro (as y at), ácido (bs, bt) y alcalino (cs y ct).	72
Figura 3.13.- Degradación del Tecoflex [®] en medio: neutro (as y at), oxidativo (bs y bt), ácido (cs, ct) y alcalino (ds y dt).	73
Figura 3.14. Difractogramas de poliuretanos segmentados sin degradar y degradados.	75
Figura 3.15. Efecto de la degradación oxidativa con catálisis.....	78
Figura 3.16. Efecto de la degradación oxidativa con catálisis sobre las propiedades mecánicas de los PU.....	80
Figura 3.17.- Representación esquemática de la hidroxilación de grupos éster por hidrólisis alcalina.	83
Figura 3.18. Ángulos de contacto de los poliuretanos.....	83

Figura 3.19. Injerto de glutaraldehído a través de grupos hidroxilo.....	84
Figura 3.20. Injerto de L-cisteína a través de un puente de glutaraldehído..	85
Figura 3.21. Tiempos de coagulación con sangre completa para poliuretanos sin modificar y modificados.....	88
Figura 3.22. Tiempo de Tromboplastina Parcial activada de poliuretanos sin modificar y modificados.	89
Figura 3.23. Tiempo de protrombina de poliuretanos sin modificar y modificados.....	90
Figura 3.24. Caracterización superficial de muestras expuestas a sangre completa. Primera columna 450x y segunda columna 3500x.	92
Figura 3.25. Caracterización superficial de muestras expuestas a plasma sanguíneo con reactivo de TTPa. Primera columna 450x y segunda columna 3500x.....	94
Figura 3.26. Caracterización superficial de muestras expuestas a plasma sanguíneo con reactivo de TP. Primera columna 450x y segunda columna 3500x.....	95
Figura Ia . Espectro de infrarrojo de DTE	113
Figura IIa. H ¹ RMN de PU de un paso	114
Figura IIb. Termogramas de DSC para PU de un paso. a) PU con BDO y b) PU con DTE. En primera (línea continua) y segunda corrida (línea punteada).....	114
Figura IIIc. Análisis termogravimétrico de PU-BDO.....	115
Figura IIIId. Análisis termogravimétrico de PU-DTE.....	115

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Factores que intervienen en la cascada de coagulación.....	33
Tabla 2.1. Formulaciones de los SPUs sintetizados.	40
Tabla 3.1. Pérdida de masa (%) por degradación de los poliuretanos a 100°C por 24h.	61
Tabla 3.2. Propiedades mecánicas de los SPUs sometidos a pruebas de degradación oxidativa.	81

RESUMEN

Poliuretanos segmentados (SPUs) fueron sintetizados con 4,4'-metileno bis(ciclohexil isocianato) (HMDI), poli-(ϵ -caprolactona) diol (PCL) y como extendedor de cadena, butanodiol (BD) o ditioeritritol (DTE), denominados SPUB y SPUBSH respectivamente. Estos polímeros fueron caracterizados mediante FTIR, ^1H RMN, análisis térmico (DSC, DMTA y TGA) y sus propiedades mecánicas determinadas mediante ensayos de tensión. Los espectros de infrarrojo y de ^1H RMN no mostraron diferencias con respecto al tipo de extendedor. Sin embargo, por DMTA fue detectada la transición α a -23°C cuando se usó BD y a 4°C cuando se usó DTE como extendedor. Mecánicamente estos SPUs exhibieron deformaciones mayores a 600%.

SPUB, SPUBSH y Tecoflex[®] fueron degradados químicamente bajo reflujo en medios ácidos (HCl 2N), alcalinos (NaOH 5M) y oxidantes (H_2O_2 30%) y caracterizados gravimétricamente, y por FTIR, DSC, TGA, DRX y MEB. Se observó que la degradación de SPUB y SPUBSH es preferentemente en medios ácidos y alcalinos, a diferencia del Tecoflex[®] que se degrada por vía oxidativa. La degradación de los polímeros también se llevó a cabo con $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CoCl}_2$ a 37°C por 15 días mostrando que el SPUBSH es más susceptible al medio oxidante que SPUB.

SPUB y SPUBSH fueron modificados superficialmente con L-cisteína y se midieron sus tiempos de coagulación (Ensayo Lee-White, tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) y tiempo de protrombina (TP)). Los resultados mostraron que los tiempos de coagulación fueron mayores en SPUB sin modificar y modificado que en Tecoflex[®], mientras que SPUBSH sin modificar presentó un menor tiempo de coagulación, el cual se incrementó con la modificación con L-cisteína.

ABSTRACT

Segmented polyurethanes (SPUs) were synthesized with 4,4'-methylene-bis(cyclohexyl isocyanate) (HMDI), poly(ϵ -caprolactone) diol (PCL) and either butanediol (BD) or dithioerythritol (DTE) as chain extenders (referred as SPUB and SPUBSH respectively). These polymers were characterized by FTIR, ^1H RMN, thermal analysis (DSC, TGA and DMTA), and tensile test. The infrared spectrum and ^1H RMN showed no differences with regard to the type of extender. However DMTA showed clear differences as the α transitions were detected at -23°C for SPUB and 4°C for SPUBSH. Mechanically, these SPU's exhibited deformations higher than 600%.

SPUB, SPUBSH and Tecoflex[®] were chemically degraded under reflux in acidic (2N HCl), alkaline (NaOH 5M) and oxidative media (H_2O_2 30%) and the residues characterized gravimetrically and by FTIR, DSC, TGA, XRD and SEM. It was observed that the degradation of SPUB and SPUBSH occurred preferably under acidic and alkaline conditions while Tecoflex[®] was degraded via oxidation. The degradation of polymers was also studied in $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CoCl}_2$ at 37°C for 15 days and it was observed that SPUBSH was more degraded than SPUB under oxidative degradation.

SPUB and SPUBSH were modified superficially with L-cysteine and their clotting times measured by the Lee-White test, activated partial thromboplastine time (aPTT) and prothrombine time (PT). The results showed that the clotting times were longer for SPUB (unmodified and modified) than Tecoflex[®], while SPUBSH exhibited a shorter clotting time than SPUB but that it was increased after modification with L-cysteine.

INTRODUCCIÓN

Los biomateriales de tipo polimérico han sido utilizados por varias décadas ya sea solos o en combinación con otros materiales. Estos polímeros presentan diferentes propiedades, y entre ellos los poliuretanos segmentados (SPUs) han sido estudiados por sus características únicas, en especial para su uso en dispositivos en contacto con sangre.

El estudio de los SPUs, y de los materiales empleados en aplicaciones cardiovasculares, es muy importante ya que las estadísticas posicionan a las enfermedades cardiovasculares como la primera causa de muerte en México y el mundo [1]. Por esta razón, es necesaria la búsqueda de materiales que eleven la calidad de los dispositivos empleados en el tratamiento de estas enfermedades.

Los SPUs generalmente son sintetizados por un método de dos pasos. El primer paso consiste en la síntesis de un prepolímero por medio de la reacción de un diisocianato con un polioliol (poliéster o polieter). En el segundo paso los grupos isocianato terminales del prepolímero reaccionan con un extendedor de cadena (diamina o diol de bajo peso molecular) [2]. La gran versatilidad de estos materiales se debe, en gran parte, a la diversidad de materiales que pueden ser utilizados en la síntesis, y que pueden modificar las propiedades o proporcionar características específicas a los SPUs. Sin embargo, estos materiales no son completamente compatibles y biofuncionales [3] ya que en ciertas aplicaciones, como en injertos vasculares de bajo calibre (de pequeño diámetro), la trombogenicidad constituye un problema de consecuencias fatales. Aunado a este problema, el medio ambiente corporal es un medio

hostil el cual induce la biodegradación del material que conduce a una pérdida en las propiedades mecánicas de los dispositivos implantados.

Los esfuerzos por mejorar la compatibilidad con la sangre han conducido a numerosos estudios, ya sea modificando la estructura del polímero o solamente su superficie. Una de las estrategias que se ha planteado es la liberación endógena de óxido nítrico (NO), el cual es un potente inhibidor de la adhesión y agregación plaquetaria [4,5]. El NO se encuentra naturalmente en forma de S-nitroso-albúmina (AlbSNO) en el plasma humano en concentraciones micromolares. Entonces, el polímero es sintetizado o modificado de manera que su superficie contenga grupos tioles (SH) superficiales que puedan intercambiar NO con la AlbSNO y liberarlo posteriormente.

Aún considerando este tipo de mejoras, los materiales sintéticos, ya sea polímeros simples, compuestos o híbridos (molécula biológica-polímero), siguen siendo inferiores en desempeño a los correspondientes tejidos humanos [6]. Por lo tanto, con el objeto de seguir mejorando la hemocompatibilidad de los materiales poliméricos y su desempeño en dispositivos cardiovasculares, también se ha recurrido a la ingeniería de tejidos [3, 7, 8].

Los polímeros biodegradables se usan en el campo de la ingeniería de tejidos como andamiajes temporales en los que las células puedan crecer y formar tejidos. Por ejemplo, en el caso de aplicaciones cardiovasculares, los materiales poliméricos actúan como matrices degradables, con una superficie modificada para soportar la introducción de células endoteliales humanas [7].

Los poliuretanos biodegradables o parcialmente biodegradables pueden ser producidos a través de la introducción en la cadena polimérica, de grupos lábiles susceptibles a la hidrólisis. La poli(ϵ -caprolactona) (PCL) [9-11] es

usada comúnmente como segmento flexible en los SPUs biodegradables (SPUBs) por ser biocompatible, ligeramente hidrolítica y enzimáticamente biodegradable, [12].

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores, en el presente trabajo se propone la síntesis de SPUs biodegradables a base de poli(ϵ -caprolactona), así como la introducción de grupos tioles en su estructura, ya sea durante la síntesis o por medio de una modificación superficial. Además puesto que los biomateriales son implantados con el objetivo de reemplazar y/o restaurar tejidos vivos y que esto implica la exposición de estos materiales de modo temporal o permanente a fluidos del cuerpo, el desarrollo de nuevos biomateriales involucra no solo su evaluación mecánica sino también el estudio de su interacción con un medio biológico [13]. Por lo tanto, los SPUs biodegradables preparados fueron caracterizados fisicoquímica, mecánica y biológicamente (ensayos de hemocompatibilidad).

En el Capítulo I de esta tesis se describen los aspectos generales relacionados con la preparación de poliuretanos y su aplicación en el campo cardiovascular. En el Capítulo II, se detallan los procedimientos experimentales seguidos tanto para la síntesis de poliuretanos SPUs biodegradables como para su caracterización. En el Capítulo III, se presentan los resultados principales encontrados y se discuten en relación a otros trabajos. Finalmente, se incluye una sección de conclusiones y de sugerencias para trabajos futuros.

OBJETIVOS

Objetivo general

Obtener poliuretanos segmentados biodegradables (SPUBs) con grupos tioles superficiales para aplicaciones cardiovasculares.

Objetivos particulares

- 1) Sintetizar SPUBs utilizando como polirol la poli- ϵ -caprolactona, HMDI como disiisocianato y butanodiol como extendedor de cadena.
- 2) Sintetizar SPUBs tiolados (SPUBSH) mediante la introducción de ditioeritritol, un extendedor de cadena con grupos tiol colgantes.
- 3) Caracterizar fisicoquímica y mecánicamente los poliuretanos sintetizados y el poliuretano de referencia (Tecoflex[®]).
- 4) Estudiar la degradación *in vitro* de los nuevos poliuretanos y del Tecoflex[®].
- 5) Modificar superficialmente al SPUB y SPUBSH mediante la introducción de grupos tioles (injerto con L-Cisteína).
- 6) Estudiar la hemocompatibilidad de SPUB, SPUBSH y Tecoflex[®] sin modificar, y de SPUB y SPUBSH modificados con L-Cisteína.

CAPÍTULO I. ASPECTOS TEÓRICOS

1.1. Poliuretanos segmentados (SPUs por sus siglas en inglés)

1.1.1. Aspectos históricos

Los primeros poliuretanos fueron desarrollados por Otto Bayer a finales de la década de los 30's. En la actualidad los poliuretanos forman una gran familia de polímeros termoplásticos y termofijos que van desde polímeros muy rígidos hasta materiales muy flexibles, de materiales compactos a espumados, y que son usados para producir barnices, fibras, textiles, plásticos y elastómeros.

Los elastómeros de poliuretano fueron estudiados con gran detalle de 1950 a 1960. Su uso para aplicaciones biomédicas fue propuesta por Pangman, Boretos y Yoda, según lo reporta Dumitriu [14].

1.1.2. Aplicaciones en el campo médico

Las numerosas aplicaciones de los SPUs están basadas en la extensa variedad de propiedades fisicoquímicas y mecánicas en paralelo con su biocompatibilidad aceptable y bioestabilidad [15]. Debido a esto, los poliuretanos han sido usados en equipo médico, como implantes, como soportes y para sustitución de tejidos [16].

Los poliuretanos son frecuentemente usados en dispositivos médicos tales como marcapasos, catéteres y dispositivos de asistencia ventricular [17]. Otras aplicaciones en contacto con sangre incluyen su uso como injertos vasculares, tubos para propósitos generales y corazones artificiales [7, 18, 19].

1.1.3. Características de los SPUs

Los poliuretanos segmentados, SPUs, son materiales versátiles con propiedades únicas e interesantes [20, 21]. Generalmente, las propiedades de los poliuretanos dependen de muchos factores, entre las que se encuentran la estructura (composición) de los segmentos rígidos o flexibles, la presencia de enlaces por puente de hidrógeno, la separación de fases, el peso molecular y el método de síntesis [22, 23]. Todos estos factores determinan el desempeño de los SPU en aplicaciones biomédicas.

Entre las ventajas propias de estos materiales se pueden mencionar, la facilidad de preparación, el amplio intervalo de propiedades físicas y mecánicas, estabilidad durante la esterilización, y fácil adaptación al medio ambiente biológico. En el caso de los SPUs con aplicaciones biomédicas, la resistencia mecánica y su hemocompatibilidad son dos de las características más importantes que hay que considerar [23].

1.1.3.1. Estructura y composición química

Los SPUs son copolímeros en bloque, producto de la reacción de isocianatos orgánicos, polioles y extendedores de cadena de bajo peso molecular. Están constituidos de *segmentos flexibles* y *segmentos rígidos* conectados por enlaces uretano (figura 1.1). El resto del polímero puede contener una variedad de grupos funcionales tales como poliéteres, poliésteres, ureas, epóxidos, siliconas, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, e incluso poliolefinas [2, 23-26].

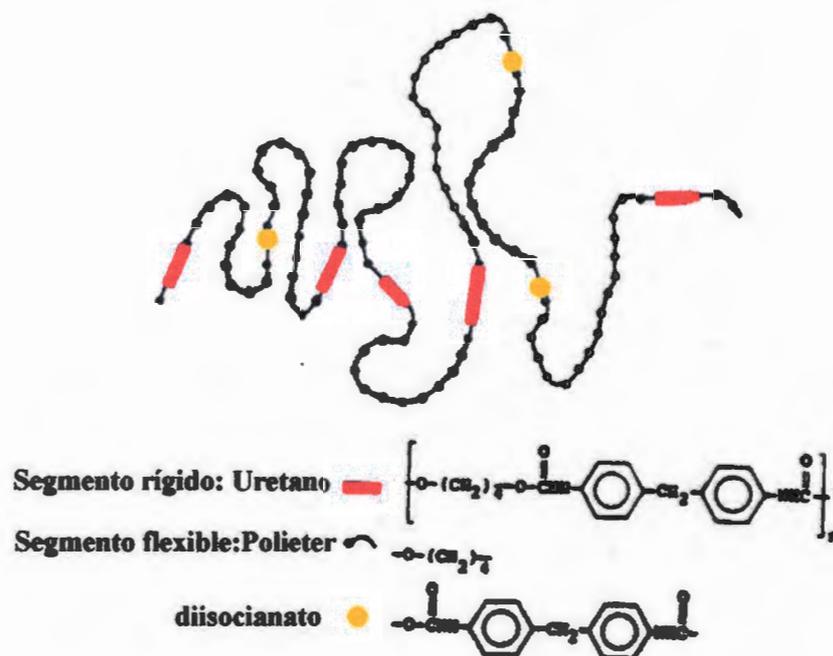


Figura 1.1. Estructura lineal de un SPUs [14].

Los SPUs pueden ser representados por tres componentes básicos como se describe en la siguiente formula general:



donde P es el polioliol, D es el diisocianato y C es el extendedor de cadena. Típicamente el polioliol, o también llamado segmento flexible, es una macromolécula oligomérica que comprende una cadena con una temperatura de transición vítrea baja ($< 25^\circ\text{C}$) y grupos hidroxilos terminales (-OH). Los polioliol convencionales son usualmente poliéteres (con una estructura repetitiva -R-O-R') o poliésteres (con una estructura repetitiva -R-CO-O-R') y con grupos terminales hidroxilo [27]. Sin embargo, también se han utilizado

polioles provenientes de policarbonatos y polibutadienos como segmentos flexibles resistentes a medios oxidantes [28-30].

El extendedor de cadena es usualmente una molécula pequeña ya sea con grupos terminales amino o hidroxilo. El diisocianato es una molécula de bajo peso molecular que puede reaccionar con los hidroxilos del poliol o del extendedor de cadena [27].

Una característica de los poliuretanos es la variedad de cambios estructurales que pueden ser producidos utilizando diferentes compuestos hidroxilo e isocianatos, conduciendo a un amplio espectro de propiedades y aplicaciones [21]. Por ejemplo los SPUs pueden sintetizarse con propiedades que van desde estructuras porosas muy rígidas a membranas lisas elastoméricas [23]. Pese a esta variedad en propiedades, la síntesis de nuevos SPUs sigue siendo activamente investigada [22, 24, 31-34].

Las propiedades de los SPUs o poliuretanos segmentados reflejan el balance de su composición estructural. La fase de segmento rígido actúa como un agente de entrecruzamiento físico para restringir la extensión de los segmentos flexibles y proporciona una fuerza retráctil para regresar a la forma inicial. Del mismo modo, se ha reportado que es posible alterar las propiedades térmicas y elastoméricas de los SPUs utilizando dos o más estructuras en la fase rígida del poliuretano. Los elastómeros preparados de este modo presentan propiedades no exhibidas por elastómeros con un solo segmento rígido. De esta manera, se espera que la adición de un segundo segmento flexible, con diferencias sustanciales en las propiedades físicas, pueda modular significativamente las propiedades elastoméricas [35].

La incorporación de grupos funcionales adicionales en el segmento rígido puede afectar su separación en microfases, además de modificar la

superficie y la masa de los poliuretanos. Numerosas investigaciones sobre poliuretanos funcionalizados se han efectuado con el objetivo de estudiar la relación entre la estructura y los cambios de compatibilidad con otros polímeros o materiales. Se ha reportado que los grupos funcionales adicionales tienen un efecto marcado en las propiedades de los poliuretanos [20].

1.1.3.2. Segmento rígido y segmento flexible

Los *segmentos rígidos* o bloques rígidos, compuestos del diisocianato y el extendedor de cadena, tienen una T_g por arriba de la temperatura ambiente y actúan como refuerzos vítreos o semicristalinos en los SPUs. Los enlaces uretano de los segmentos rígidos muestran enlaces secundarios que proveen mejores propiedades mecánicas [25, 26].

Los diisocianatos usados más comúnmente son el 2,4-tolileno diisocianato (TDI) y el metileno di(4-fenildiisocianato) (MDI), siendo este último muy usado en la síntesis de poliuretanos para aplicaciones médicas. También son utilizados diisocianatos alifáticos como el 1,6-hexametilendiisocianato (HDI) [36] y el 4,4'-metileno bis(ciclohexildiisocianato) (HMDI). Los SPU a base de este último, presentan una estabilidad excelente a la radiación UV, una retención superior de sus propiedades a temperaturas elevadas y mejores propiedades mecánicas [32, 33]. Recientemente se ha empleado el 1,4-butanodiisocianato, así como una variedad de diisocianatos a base de lisina especialmente en la elaboración de poliuretanos biodegradables.

Otro componente del segmento rígido lo forman los extendedores de cadena, los cuales son usualmente glicoles alifáticos cortos o diaminas de 2 a 6 átomos de carbono.

El *segmento flexible* en los SPUs está formado usualmente de un poliol, con un peso molecular de varios cientos o miles de daltons. El poliol le imparte flexibilidad o elasticidad al poliuretano, proporciona un carácter relativamente hidrofílico y contribuye a su bioestabilidad. Los segmentos flexibles en los SPUs, típicamente polioles tipo poliéter o poliéster, tienen una T_g mucho más baja que la temperatura ambiente permitiendo por lo tanto un comportamiento tipo elastomérico [25, 26].

En general, las propiedades de elasticidad y flexibilidad a baja temperatura de los SPUs elastoméricos son el resultado de propiedades del segmento flexible. Sin embargo, el conjunto de propiedades es algunas veces el resultado de interacciones entre los segmentos rígidos y flexibles [35].

La proporción de los segmentos rígidos en el polímero tiene gran influencia en el módulo elástico, la rigidez, la resistencia a la tensión y la temperatura máxima de uso. Los SPUs con bajo contenido de segmento rígido, pueden mostrar propiedades elásticas y alta elongación a la ruptura [22].

1.1.3.3. Separación de fase

En los SPUs la separación de microfase es el resultado de incompatibilidad termodinámica entre las unidades estructurales de los segmentos rígidos y flexibles [20]. El parámetro de solubilidad entre el segmento flexible y el segmento rígido es significativamente diferente, genera una gran incompatibilidad de fase y conduce a una estructura de dos fases.

Esta microseparación es la responsable de las excelentes propiedades elastoméricas de los poliuretanos [37, 38].

El grado de inmiscibilidad entre segmentos puede ser controlado por medio de muchos factores tales como la estructura y masa molecular de los mismos, así como la composición y naturaleza del extendedor de cadena e historia térmica.

Los grupos uretano en los SPUs forman puentes de hidrógeno como resultado de las interacciones de los grupos NH con los grupos CO en el uretano o urea y, en menor proporción, con grupos éter o éster del segmento flexible [22]. De esta manera, las interacciones moleculares no covalentes a través de puentes de hidrógeno entre segmentos rígidos, conducen a la formación del dominio rígido disperso en la matriz de segmentos flexibles como se esquematiza en la figura 1.2 [20].



Figura 1.2. Organización de los segmentos rígidos y flexibles en la molécula de SPUs [14].

1.1.3.4. Peso molecular y método de síntesis

El peso molecular de los SPUs depende del método de síntesis y este influye en el valor de temperatura de transición vítrea (T_g). La poliadición en masa o en fundido, contrario al método de solución, produce SPUs con una estrecha distribución de pesos moleculares en las secuencias de segmentos rígidos [22].

Sánchez-Aduzuar *et. al.* [39] realizaron estudios en poliuretanos termoplásticos mostrando que la prepolimerización (primer paso de la reacción) es la responsable de las propiedades finales de estos poliuretanos, por lo que este paso debe ser cuidadosamente controlado para obtener polímeros con propiedades adecuadas.

Un factor muy importante en el aumento de los pesos moleculares de los poliuretanos son las reacciones de ramificación y entrecruzamiento, a través de la formación de enlaces de biuret y alofanatos (NCO residuales pueden reaccionar con los grupos $-NHCOO-$ del uretano o con los grupos $NHCONH$ de una urea). Estas reacciones están muy relacionadas con el método de síntesis; por ejemplo, se sabe que la síntesis en masa aumenta el grado de entrecruzamiento mediante la formación de alofanatos [17, 40].

La temperatura de reacción es un factor muy importante para la extensión de la reacción, así como para la formación de alofanatos. Heintz *et al* [41] mostraron que después de los $100^{\circ}C$, un pequeño incremento en la temperatura de reacción puede incrementar la presencia de alofanatos desde una cantidad insignificante hasta por arriba del 10% del contenido de nitrógeno. Sin embargo, en este caso no se observó necesariamente un aumento en el peso molecular de los poliuretanos.

1.1.3.5. Propiedades mecánicas

Los segmentos rígidos se entrecruzan entre sí con la masa del elastómero para formar aglomerados que actúan como rellenos, mejorando la resistencia mecánica del material. Por otro lado, los segmentos flexibles permanecen libres y con un arreglo aleatorio (figuras 1.3a y 1.3b). Bajo un esfuerzo de tensión mayor de 150%, el segmento flexible (poliéter o poliéster) se alinea a lo largo del eje de tracción, desplazando los segmentos rígidos que se alinean más o menos perpendiculares al eje de tracción. Los segmentos flexibles se sitúan en estrecha proximidad entre sí conduciendo a la formación de una estructura cristalina, siendo este un proceso que se completa cuando la elongación alcanza aproximadamente 250% (figura 1.3a). Cuando la elongación se incrementa aún más (~500%), los enlaces de entrecruzamiento químico del segmento rígido se rompen y el ahora nuevo segmento rígido separado se alinea a lo largo del eje vertical. En este punto el segmento flexible se relaja debido al estiramiento por la liberación de los segmentos rígidos (figura 1.3b).

Los poliuretanos segmentados tienen un comportamiento elástico a bajos esfuerzos y este comportamiento comienza a ser plástico cuando se rompe la red de segmentos rígidos. Las muestras deformadas no regresan inmediatamente a su forma original una vez removido el esfuerzo. Sin embargo, los rearrreglos de los segmentos rígidos resultan finalmente en un regreso parcial o total a la forma inicial, dependiendo de la estructura del elastómero. A mayor concentración de segmentos rígidos, mayor deformación plástica; y con una baja concentración de segmentos rígidos, mayor comportamiento elástico.

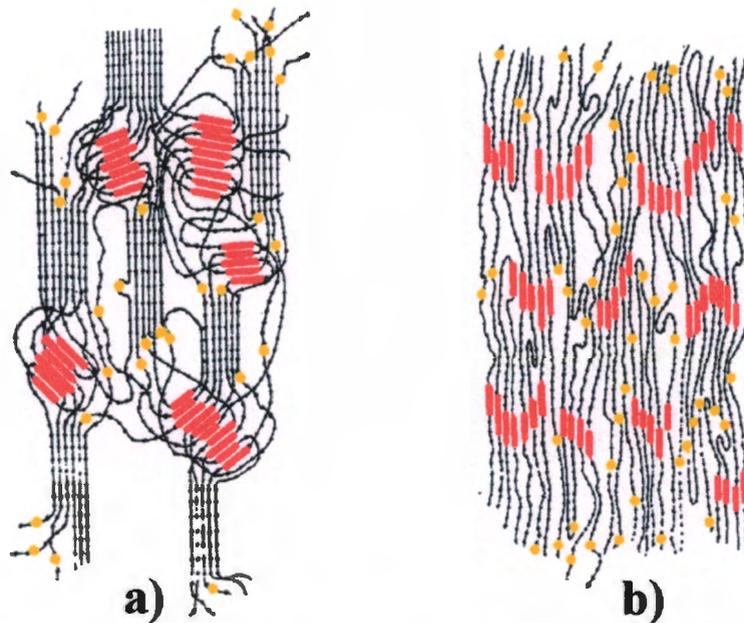


Figura 1.3. a) SPU sometido a esfuerzo de tensión. b) Relajación en SPUs sometidos a esfuerzo de tensión [14].

Las propiedades mecánicas también dependen de la relación entre segmentos rígidos y flexibles. Una mayor proporción de segmentos rígidos hace que el material posea una mejor resistencia disminuyendo su elasticidad y su resistencia a la abrasión. La presencia de segmentos flexibles largos ya sea de poliéteres o poliésteres proporciona una alta deformación antes de su fractura pero hace al material más sensible a la oxidación y degradación por fluidos biológicos y su falla esfuerzos cíclicos [14].

En general, los poliuretanos tienen una resistencia a la fatiga excepcional, lo cual hace atractivos a los elastómeros para aplicaciones que requieren una larga exposición a cargas dinámicas y fatiga [42].

1.2. Biodegradación de poliuretanos

Aunque los SPUs han sido seleccionados tradicionalmente por sus excelentes propiedades mecánicas y una aceptable hemocompatibilidad presentan problemas de bioestabilidad a largo plazo [27]. La causa de lo anterior es que los tejidos vivos presentan un medio ambiente muy agresivo y aunque los polímeros parezcan muy estables *in vitro*, pueden ser dramáticamente degradados *in vivo*.

1.2.1. Influencia del medio ambiente biológico.

La degradación *in vivo* del polímero resulta principalmente de la acción sinérgica de componentes enzimáticos en los fluidos corporales, agentes oxidantes y esfuerzos mecánicos. La α -2-macroglobulina, la colesterol estearasa, la fosfolipasa A2, la proteinasa K y la catepsina B son enzimas que promueven la biodegradación de los poliuretanos [14].

Aunque las enzimas son diseñadas para interacciones altamente específicas con sustratos biológicos particulares, algunos parecen ser capaces de reconocer y actuar sobre sustratos no naturales tales como los polímeros [27].

Los glóbulos blancos juegan un papel importante en la degradación *in vivo*. Ensayos realizados en estas condiciones, usando el sistema de implante de jaula han mostrado la adhesión a la superficie de neutrófilos, monocitos y macrófagos derivados de monocitos (MDM), las cuales a su vez dan lugar a las células gigantes multinucleadas derivadas de reacciones a cuerpos extraños. Uno de los eventos que ocurren como una respuesta inmune innata es la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés).

Los neutrófilos y monocitos por su parte liberan ácido hipocloroso (HClO) e hidrolasas lisosomales como parte de su reacción a superficies extrañas, aunque el papel de estas células disminuye con el paso del tiempo. Conforme la reacción al cuerpo extraño progresa, los MDM activados producen ROS en respuesta a la superficie del material y en este caso el producto final es peróxido de hidrógeno [43, 44].

1.2.2. Mecanismos de degradación

La falla *in vivo* de dispositivos cardiovasculares poliméricos se ha atribuido principalmente a reacciones de hidrólisis, oxidación, calcificación y formación de fisuras por esfuerzos ambientales (ESC por sus siglas en inglés). Asimismo, la degradación puede ser el resultado de una combinación de varios mecanismos, aunque uno puede dominar sobre los otros.

La naturaleza química de los SPUs es importante para entender el por qué algunos sufren una degradación más rápida que otros [27, 45]

1.2.2.1. Degradación hidrolítica

En general, se ha observado que los poliéster-uretanos son más susceptibles a la degradación hidrolítica, aunque son más resistentes a la degradación oxidativa. Lo anterior es debido a que la presencia de numerosos enlaces éster los hace más vulnerables a hidrólisis en medios ácidos o alcalinos [17, 46, 47].

1.2.2.2. Degradación oxidativa

Los segmentos flexibles de los poliuretanos, especialmente los segmentos flexibles tipo éter, son particularmente susceptibles al daño oxidativo [48]. Del mismo modo, se ha observado que los dispositivos de

poliéter-uretano que contienen componentes metálicos están sujetos a oxidación catalizada por iones metálicos, especialmente cobalto. Estos iones metálicos son producidos por la corrosión o el desgaste de algunos componentes en los dispositivos biomédicos [14, 17, 27].

1.2.2.3. Calcificación

La calcificación o mineralización (formación de fosfatos de calcio tipo apatita) ocurre ampliamente tanto en dispositivos médicos cardiovasculares como en los no cardiovasculares. De hecho, la calcificación es la causa de falla más importante para muchas válvulas cardíacas biológicas y limita el tiempo de vida funcional de bombas de sangre mecánicas experimentales y válvulas cardíacas poliméricas, incluyendo las fabricadas con SPU's [27, 45].

La calcificación de poliuretanos utilizados en válvulas cardíacas se ha estudiado en experimentos *in vitro*. Sin embargo, la calcificación ha sido mínima y exclusivamente asociada con las regiones de falla del material indicando que los poliuretanos tienen una capacidad intrínseca para la calcificación mucho mas baja que el pericardio bovino o las aortas porcinas, materiales muy utilizados para fabricar válvulas cardíacas. Estos materiales han mostrado mucha mayor calcificación bajo las mismas condiciones [49].

1.2.2.4. Formación de fisuras por esfuerzos ambientales

Los SPU's tipo éter son conocidos por ser susceptibles a un fenómeno degradativo que involucra la formación y propagación de grietas. Este fenómeno de microfisura, es conocido como formación de fisuras por esfuerzos ambientales (ESC) [27].

La formación de fisuras por esfuerzos ambientales de los poliuretanos usados en dispositivos médicos implantables es un fenómeno bien documentado. Generalmente se piensa que es el resultado de la degradación química en el medio ambiente hostil *in vivo* combinado sinérgicamente con esfuerzos mecánicos. Los esfuerzos mecánicos ocasionan un incremento en la velocidad a la cual los defectos microscópicos, creados por la escisión de la cadena durante la degradación química, crecen hasta un tamaño crítico para iniciar la fisura [42].

Este fenómeno de formación de microfisuras, también se cree que es el resultado de esfuerzos residuales en la superficie polimérica, que pueden ser introducidos durante la fabricación y no ser reducidos suficientemente durante el recocido o envejecimiento del polímero [27].

1.3. Polímeros biodegradables.

El diseño y desarrollo de productos de ingeniería de tejidos ha sido beneficiado desde hace muchos años por la utilización de un amplio intervalo de polímeros biodegradables. Los polímeros biodegradables desarrollados recientemente y las modificaciones novedosas a polímeros biodegradables existentes, han aumentado las herramientas clínicamente disponibles para crear aplicaciones en ingeniería de tejidos. El incremento en la demanda de biomateriales para implantes médicos sofisticados y novedosos, ha aumentado el interés por mejorar el desempeño de los polímeros de grado médico y el desarrollo de nuevos polímeros sintéticos biodegradables [50]

Los nuevos biomateriales poliméricos biodegradables comerciales incluyen a los poliortoésteres, polianhídridos, polisacáridos, poliéster amidas, poliarilatos a base de tirosina, poliimino carbonatos o policarbonatos, poli(D-

L-lácturo-uretano), polihidroxitirato, policaprolactona, poli(bis-carboxilato fenoxi) fosfaceno, poli aminoácidos, pseudo poliaminoácidos y copolímeros derivados de aminoácidos y otros monómeros [51].

1.3.1. Ventajas de los biomateriales poliméricos biodegradables

El interés en los biomateriales poliméricos biodegradables para aplicaciones en ingeniería biomédica se ha incrementado dramáticamente en la década pasada. Esto se debe a que esta clase de materiales presentan dos ventajas importantes que no tienen los biomateriales no biodegradables. En primer lugar, no presentan una reacción crónica a cuerpo extraño de manera permanente debido al hecho de que son gradualmente absorbidos por el cuerpo humano y que no se retienen trazas o residuos en los sitios de implantación. En segundo lugar, se ha observado que algunos de estos polímeros son capaces de regenerar tejido, mediante técnicas de ingeniería tisular. De allí que los implantes quirúrgicos hechos de biomateriales biodegradables puedan ser usados como andamios para regeneración de tejidos [51].

Un andamio sintético para tejidos blandos mecánicamente activos, tales como las arterias, debe ser lo suficientemente elástico para permitir la transferencia de esfuerzos y también degradarse a una velocidad que puedan permitir a los componentes celulares ser expuestos gradualmente a cargas mecánicas y responder adecuadamente.

Además de las propiedades mecánicas y de degradación, algo muy importante es el procesamiento del andamio de tal manera que tenga la arquitectura apropiada para aumentar la bioactividad en la forma de adhesión, crecimiento y señales de diferenciación.

Recientemente, se ha registrado un creciente interés en el campo de los biomateriales elastoméricos hidrolíticamente lábiles para aplicaciones en ingeniería de tejidos. Se han realizado numerosas investigaciones empleando la funcionalidad de los poliésteres, principalmente por presentar este tipo de labilidad. Entre los biomateriales estudiados se encuentran poliésteres termoplásticos o termofijos y poliuretanos preparados con poliéster como segmento flexible, así como polímeros entrecruzados con funcionalidad poliéster. Algunos investigadores se han interesado particularmente en los poliuretanos lineales debido a su inherente flexibilidad y facilidad de procesamiento.

Aunque la vasta mayoría de los andamios sintéticos de ingeniería de tejidos se degradan por simple hidrólisis, también pueden ser remodelados enzimáticamente en el organismo [8].

1.3.2. Síntesis de SPUs biodegradables

Los SPUs biodegradables pueden ser producidos a través de la introducción de enlaces hidrolizables en la cadena por una variedad de vías. El método más común para introducir estos enlaces es la utilización de segmentos flexibles tales como polilacturos y poli (ϵ -caprolactona).

El otro medio para producir poliuretanos elastoméricos biodegradables involucra la introducción de grupos hidrolizables a través del segmento rígido. Debido a que relativamente pocos diisocianatos pueden obtenerse para la síntesis de los poliuretanos, el uso de extendedores de cadena hidrolizables, es el método más factible para producir segmentos rígidos hidrolizables [52].

1.3.2.1. Segmentos flexibles biodegradables (Policaprolactona, PCL)

La PCL se encuentra entre los poliésteres biodegradables, más atractivos y más comúnmente usados. Puede ser empleado para diferentes aplicaciones biomédicas tales como andamios en ingeniería de tejidos y para la liberación controlada de fármacos [53]. La PCL se utiliza comúnmente como segmento flexible en poliuretanos ya que se reconoce como biocompatible, así como degradable hidrolítica y enzimáticamente a una velocidad más lenta que otros poliésteres biodegradables [12].

La poli (ϵ -caprolactona) (PCL) es un polímero semicristalino con un punto de fusión de alrededor de 60°C y una temperatura de transición vítrea de -60°C; es decir, la PCL se encuentra en estado huloso a temperatura ambiente. La presencia de cinco grupos metileno no polares en la unidad repetitiva de la PCL proporciona propiedades únicas que son similares a las poliolefinas, mientras que la presencia de enlaces éster hidrolíticamente inestables ocasiona que el polímero sea biodegradable [54, 55]. Otra propiedad interesante de la PCL es su alta estabilidad térmica. Mientras otros poliésteres tienen una temperatura de descomposición (T_d) entre 235-255°C, la PCL tiene una T_d de 350°C, la cual es más típica de poliolefinas que de poliésteres alifáticos.

La PCL exhibe propiedades poco usuales; por ejemplo una alta permeabilidad para muchas drogas terapéuticas, lo que contribuye indudablemente a su uso farmacológico. Así mismo su baja temperatura de transición vítrea permite que sea utilizado para sintetizar elastómeros termoplásticos biodegradables [50, 56].

La degradación de la PCL y de sus copolímeros procede principalmente por vía enzimática y depende de factores tales como su peso molecular, composición y morfología [57, 58].

La PCL se degrada, tanto en masa como por erosión de la superficie siendo el ácido 5-hidroxi hexanoico (ácido caproico) el producto de la degradación. Los productos de la degradación de la PCL pueden ser metabolizados a través del ciclo de Krebs o eliminados directamente por secreción renal y, por esta razón, la PCL es reconocida como no tóxica y compatible con tejidos. Debido a estas propiedades ha sido usada como copolímero en la manufactura de suturas biodegradables bajo la denominación Monacryl® así como en Capronor®, un dispositivo subdérmico anticonceptivo implantable a 1 año.



Figura 1.4. Esquema simplificado de la metabolización de la PCL.

Una característica importante de la PCL es su hidrofobicidad, lo cual le permite degradarse más lentamente que el ácido poliglicólico (PGA) o el ácido poliláctico (PLLA), que son polímeros más hidrofílicos y por tanto degradables en un menor plazo [50, 54, 59].

Otra propiedad interesante de la PCL es su propensión para formar mezclas compatibles con un amplio intervalo de polímeros así como ser copolimerizado con otros monómeros. La toxicología de la PCL ha sido extensamente estudiada como parte de la evaluación de Capronor[®]. Con base en un gran número de pruebas, el monómero y el polímero son comúnmente reconocidos como materiales no tóxicos y compatibles con tejido humano. Consecuentemente el sistema Capronor[®] fue aprobado en la fase I por la FDA y actualmente se encuentra en fase II (etapa de ensayo clínico) [50].

Otros estudios sobre la biodegradación de la PCL y sus copolímeros, han mostrado que estos se degradan tanto *in vivo* como *in vitro* por hidrólisis en masa, con una velocidad de degradación que se ve afectada por factores tales como, el tamaño y forma del dispositivo, así como la presencia de aditivos.

La equivalencia cinética de la degradación de la PCL en *buffer* y utilizando conejos como modelo animal fue realizada mediante la medición de la viscosidad intrínseca del polímero durante 60 semanas. De acuerdo a estos estudios se observó que la PCL se degrada en dos fases. En la primera fase ocurre una escisión hidrolítica al azar de la cadena, lo cual resulta en una reducción del peso molecular del polímero. En la segunda fase los fragmentos de bajo peso molecular y las partículas de polímero pequeñas son alejadas del sitio de implantación por medio de su solubilización en fluidos corporales, aunque también puede ocurrir fagocitosis, lo que resulta en pérdida de masa.

Todas estas características y propiedades han hecho que la PCL sea comúnmente usada como segmento flexible en poliuretanos biodegradables. Para este fin, la PCL en forma de α,ω -hidroxi-poli- ϵ -caprolactona (figura 1.5) es generalmente sintetizada mediante polimerización por apertura de anillo de ϵ -caprolactona usando un iniciador, un agente de transferencia (diol) y un catalizador [12,60].

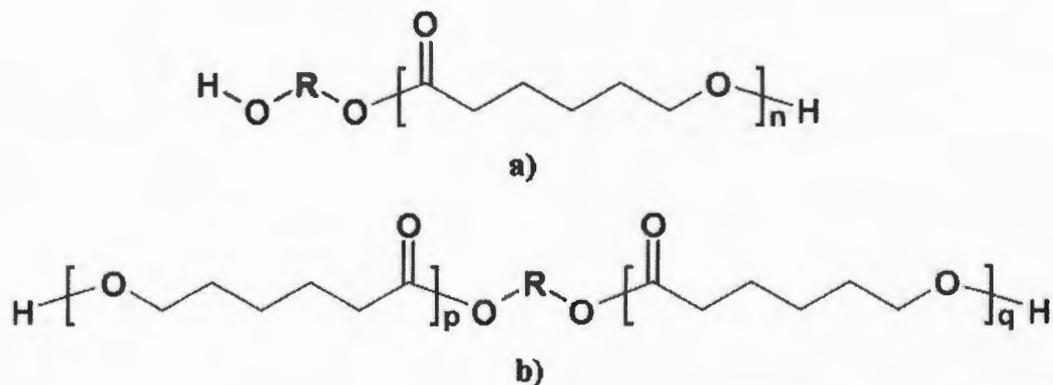


Figura 1.5. Estructuras de la α,ω -hidroxi- poli- ϵ -caprolactona, donde R depende del iniciador empleado en la síntesis. Con iniciador, a) monosustituido y b) bisustituido [60].

1.3.2.2 Segmentos rígidos degradables.

Los poliuretanos comerciales usados comúnmente (Estane[®], Biomer[®] y Pellethane[®]) han sido preparados con diisocianatos aromáticos. Sin embargo, se ha reportado que los productos de la degradación de poliuretanos a base de diisocianatos aromáticos son diaminas aromáticas que pueden ser carcinogénicas y mutagénicas [61]. El hecho de que si la concentración de estos productos de degradación es perjudicial y si alcanza un nivel fisiológicamente relevante, se encuentra aún sin resolver y en debate.

Como alternativas a los isocianatos aromáticos, y para eliminar las aminas aromáticas como subproductos, se han utilizado diisocianatos a base

de L-lisina y otros aminoácidos. La síntesis de poliuretanos biodegradables a partir de estos diisocianatos se lleva a cabo esperando que de esta manera se generen solamente subproductos no-tóxicos. En la literatura se ha reportado que si estos diisocianatos fueran liberados por hidrólisis de los enlaces uretano, podrían reaccionar con agua para regenerar la L-lisina etil éster, un producto esencialmente no tóxico [62, 63].

Otros investigadores han utilizado diisocianato de lisina (LDI) para desarrollar poliuretanos elastoméricos lineales y entrecruzados, para aplicaciones biomédicas, y no han descrito ninguna respuesta tóxica o tumorigénica significativa durante su implantación. Por el contrario los poliuretanos a base de LDI han sido reportados como biocompatibles a las células y tejidos [62].

Los segmentos rígidos a base de 1,4-butano diisocianato (BDI) también pueden ser buenas alternativas no tóxicas ya que los productos de degradación esperados son la 1,4-butanodiamina o putrescina, una diamina no tóxica que entre otras funciones es esencial para el crecimiento y diferenciación celular. Además, se ha reportado que poliuretanos con segmentos rígidos a base de BDI pueden poseer propiedades mecánicas adecuadas [8, 12, 64].

1.4. Hemocompatibilidad

La compatibilidad sanguínea o hemocompatibilidad es uno de los factores más importantes para el uso de un material en aplicaciones cardiovasculares. La interacción de los materiales con los componentes sanguíneos puede ser reducida cuando se introducen moléculas compatibles con la sangre en la superficie de los órganos artificiales. Los poliuretanos, debido a su gran variedad de composiciones químicas, han sido usados en

aplicaciones cardiovasculares principalmente por su buena compatibilidad sanguínea [65, 66].

1.4.1. Sistema de coagulación

La coagulación o hemostasia es un proceso natural, de vital importancia para evitar hemorragias y restablecer el flujo sanguíneo en caso de lesión o trauma.

La hemostasia se divide en dos partes, la hemostasia primaria donde se lleva a cabo la interacción entre el endotelio y las plaquetas, y por otro lado, la hemostasia secundaria o coagulación, que se lleva a cabo por medio los factores de coagulación (enzimas, cofactores y superficies fosfolipídicas) en un proceso no lineal conocido como cascada de coagulación [14, 67].

La cascada de coagulación puede entenderse como un amplificador biológico que permite el inicio de un evento, el cual se multiplica en un proceso suficientemente amplio para producir la homeostasis local y prevenir la pérdida de sangre, además de permitir la reparación del tejido dañado. En general a este proceso se le llama coagulación o trombosis, mientras que el tapón homeostático resultante es referido como trombo [68].

1.4.2. Respuesta de la sangre ante superficies artificiales

Cuando un cuerpo extraño es puesto intencionalmente en contacto con sangre para un propósito médico, se activan los mecanismos protectores. El mecanismo hemostático tan importante para arreglar los vasos sanguíneos puede producir consecuencias adversas ante la presencia de una superficie artificial, involucrando un complejo sistema de reacciones no deseadas entre la superficie, las plaquetas y las proteínas de coagulación. [14, 25].

Las reacciones superficie-sangre empiezan inmediatamente después de la superficie extraña es puesta en contacto con el flujo sanguíneo, siendo posible enlistar diferentes interacciones entre las que se encuentran la adsorción de proteínas, reacción plaquetaria, coagulación intrínseca, actividad fibrinolítica e interacción con células circundantes. Aún las sustancias más inertes desarrolladas hasta el momento son reconocidas como extrañas. Las interfaces tejido-material-sangre son responsables de microambientes altamente complejos. [14, 50].

1.4.2.1. Papel de la adsorción de proteínas

El primer evento que ocurre cuando un cuerpo extraño entra en contacto con sangre es la adsorción de las proteínas del plasma en la superficie. Se ha demostrado que se forma una capa de proteína sobre la superficie a los pocos segundos de entrar en contacto con la sangre. De allí que el mecanismo de adsorción de proteína sea esencial para comprender la compatibilidad polímero/sangre [14, 69, 70].

Como resultado de las diferentes fuerzas interactivas, se produce una adsorción competitiva de proteínas y glicoproteínas en la superficie del polímero, formando un recubrimiento proteico complejo. Algunos de estos procesos de adsorción son parcialmente o completamente reversibles. Dependiendo de la naturaleza de la superficie, algunas de las proteínas depositadas pueden iniciar la coagulación. Por lo tanto, para mejorar la compatibilidad sanguínea de polímeros insolubles es necesario tomar en cuenta los fenómenos que gobiernan la adsorción de las proteínas. Este último es un primer paso esencial para el desencadenamiento de la coagulación ocasionada por una superficie extraña.

Entre las proteínas de la sangre, el fibrinógeno, es una de las proteínas globulares más importantes. El fibrinógeno es altamente activo en contacto con la superficie y juega un papel importante, pues es el precursor de la fibrina, proteína insoluble e importante en la formación de trombos. En general el fibrinógeno y la gama-globulina son adsorbidas fuertemente sobre superficies trombogénicas mientras que la albúmina tiende a adsorberse en superficies más biocompatibles [70-74].

La cantidad de proteína adsorbida y la composición de esta capa de proteína dependen principalmente de la naturaleza de la superficie extraña. Desafortunadamente la hemocompatibilidad es difícil de predecir a partir de las características de la superficie [14]

1.4.2.2. Efectos plaquetarios

Las plaquetas se adhieren tanto a superficies artificiales como a vasos sanguíneos lesionados, pues estas células son extremadamente sensibles y pueden responder a una mínima estimulación. La activación causa que las plaquetas empiecen a adherirse y cambien su forma de esferas irregulares a pseudópodos espinosos (figura 1.6), acompañados por una contracción interna y extrusión del contenido granular almacenado hacia el ambiente extracelular. Los productos plaquetarios secretados (como el fosfato de adenosina), estimulan otras plaquetas, causan agregación plaquetaria irreversible y conduce a la formación de trombos de plaquetas fusionadas [25].

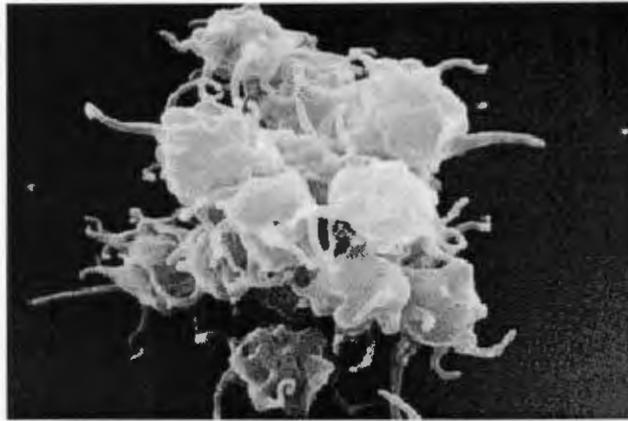


Figura 1.6. Plaquetas activadas agrupadas en un trombocito.

1.4.2.3. Cascada de coagulación

La coagulación implica una serie de reacciones complejas en las que enzimas inactivas se activan y las activadas a su vez activan a otras que están inactivadas. La nomenclatura de los componentes de estas reacciones se muestra en la tabla 1.1. El inicio de la coagulación esta dividida en dos vías, la **intrínseca** y la **extrínseca**, tal y como se aprecia en la figura 1.7.

La vía intrínseca puede ser desencadenada por contacto con un cuerpo extraño (tales como un implante) y los eventos resultantes son similares a los eventos hemostáticos habituales. Para producir la coagulación esta vía depende de la interacción de los componentes normales de la sangre (macromoléculas, células, plaquetas etc.) después de la alteración por el evento inicial.

La vía extrínseca por su parte, involucra la liberación de materiales de células externas para los procesos vasculares [68]. El material de liberación es llamado tromboplastina tisular el cual es un complejo fosfolípido-proteína (también conocido como factor III) el cual con el factor VII y Ca^{2+} activan el factor X.

Tabla 1.1. Factores que intervienen en la cascada de coagulación

Factor	Características
Vía intrínseca	
HK (Cinínógeno de alto peso molecular)	Cofactor. Forma complejos con la precalcicreína y FXI.
PK (Precalcicreína. Factor Fletcher)	Serina proteasa. Forma complejos con HK.
VIII. Factor antihemofílico A	Forma complejos con el FvW en plasma
IX. Factor Christmas	Glicoproteína
XII. Factor Hageman o de contacto	Serina Proteasa
FvW. Factor von Willebrand	Glicoproteína. Mediador de la adhesión plaquetaria.
Vía Extrínseca	
VII. Proconvertina	Glicoproteína VIIa activa X y XI
III. Factor Tisular, Tromboplastina tisular.	Glicoproteína asociada a lípidos tisular.
IV. Calcio	Cofactor
Vía Común	
I. Fibrinógeno	Glicoproteína. Mediador de la adhesión plaquetaria.
II. Protrombina	Serina proteasa. Dependiente de la vitamina K
V. Proacelerina	Cofactor monoenzimático activado por la trombina
X. Factor Stuart-Prower	Glicoproteína serina proteasa
XIII. Factor estabilizador de Fibrina	Zimógeno para transamidasa

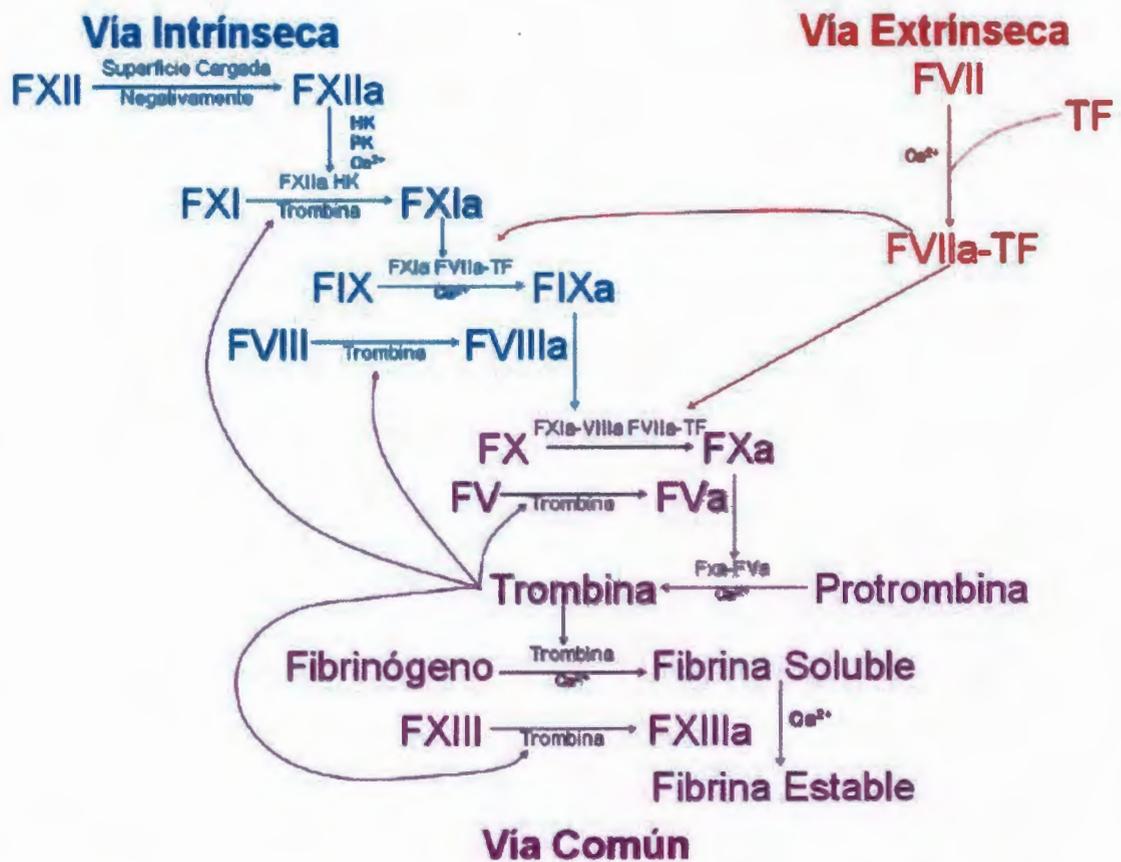


Figura 1.7. Diagrama de la cascada de coagulación, donde se observan la ruta extrínseca, intrínseca, común y todos sus cofactores.

Es reconocido desde hace tiempo que el tiempo de protrombina (análisis de coagulación) es mas corto en vidrio que en plástico. Esto es consecuencia de una relación entre el sistema de contacto y la coagulación extrínseca ya que el factor VII puede ser activado por el factor XIIIa.

Ambas vías, intrínseca y extrínseca, culminan en la generación de trombina. Bajo la influencia de una enzima clave, la trombina, se sigue una vía **común** la transformación de fibrinógeno soluble, en una red de fibrina insoluble (ver figura 1.8). [14, 68].

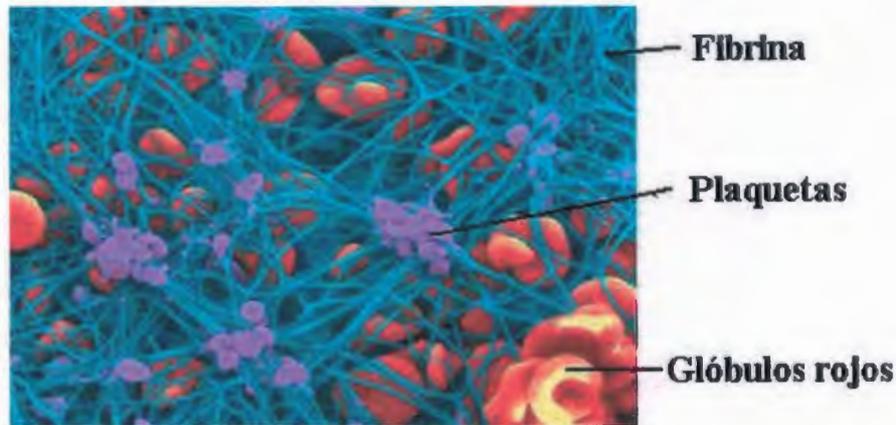


Figura 1.8. Micrografía coloreada de un trombo producido por los eventos hemostáticos.

1.4.2.4. Dependencia de la superficie de contacto con la hemocompatibilidad

El comportamiento de la superficie depende de muchos factores. De este modo, se han publicado numerosos estudios sobre la importancia de la rugosidad, mojabilidad, movilidad de la superficie, accesibilidad de ciertos grupos funcionales, cristalinidad, etc. [75, 76]. Por lo tanto, la modificación superficial ha sido un tema muy importante en el estudio de nuevos y mejores materiales para aplicaciones en contacto con sangre, así como la síntesis de materiales que presenten buenas propiedades mecánicas combinadas con buenas propiedades superficiales.

1.4.2.5. Modificación superficial para la obtención de superficies no trombogénicas

La modificación de superficies poliméricas es un campo de investigación que ha recibido mucha atención, principalmente debido a la falta de algunas propiedades superficiales específicas que son necesarias en un gran número de aplicaciones [77].

Los métodos de modificación superficial pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de enlace formado (covalente o no covalente), la fuente usada (plasma, UV, etc.) y el mecanismo (si la modificación es en la superficie existente o si se recubre la superficie existente con un material de diferente composición) [75, 78].

Uno de los métodos para producir superficies antitrombogénicas es la inmovilización de moléculas tales como la heparina, la cual inhibe la transformación de fibrinógeno en fibrina y conduce a bajos niveles de adhesión plaquetaria. También se han probado el sulfato de condroitina y el ácido hialurónico como reductores de la adhesión plaquetaria [66].

Debido a que la actividad anticoagulante de la heparina se debe a los sulfatos y grupos aminosulfatos, muchos autores han trabajado en SPUs sulfonados, para reducir la adhesión plaquetaria y adsorción de proteína [7, 18, 19, 79, 80].

Otro método para reducir la trombogenicidad es la preparación de superficies hidrofílicas por injerto de polímeros que posean esta característica, como en el caso del poli(óxido de etileno) (PEO) y polietilenglicol (PEG). Las superficies preparadas con polímeros hidrofílicos tienen una tensión superficial más baja para las soluciones acuosas y adsorben una cantidad más baja de proteínas [19, 81, 82].

Una de las principales razones para la trombogenicidad en dispositivos artificiales es la falta de endotelio, el cual normalmente sintetiza numerosos inhibidores de trombosis. En este sentido ha habido varios intentos para producir superficies biomiméticas y se ha propuesto el sembrado de células endoteliales en la superficie polimérica [82].

1.4.2.6. Liberación endógena de óxido nítrico

Recientemente se han investigado sistemas de liberación de óxido nítrico (NO) para aplicaciones cardiovasculares debido a que el NO, es una molécula mensajera que sirve para inhibir la adhesión, agregación y activación plaquetaria, así como para relajar el músculo liso y modular la neurotransmisión. Las células vasculares endoteliales sintetizan y liberan NO y prostaciclina para minimizar la agregación plaquetaria en las paredes de los vasos.

Para imitar la superficie de los vasos sanguíneos, el NO o bien donadores de NO han sido incorporados en las superficies poliméricas, reduciéndose de este modo la activación y depositación plaquetaria *in vitro* y *ex vivo*. Sin embargo, en todas las aplicaciones el NO ataca la superficie del polímero antes de los estudios de depositación plaquetaria. Por otra parte, una alta velocidad de liberación de NO puede tener efectos citotóxicos y mutagénicos, mientras que una baja velocidad de liberación puede no ser suficiente para inhibir la adhesión plaquetaria y agregación. Sumándose a todo esto, las partes donadoras de NO podrían ser tóxicas o carcinogénicas al ser liberadas o expuestas en la sangre. Por lo tanto se considera que el mejor método para mejorar la hemocompatibilidad de los polímeros biomédicos es mediante la liberación endógena de NO.

El método de liberación endógena como se muestra en la figura 1.9, utiliza al NO en la forma de S-nitrosoproteínas que, en su mayor parte se encuentran como S-nitroso-albúmina (AlbSNO) en el plasma humano en concentraciones micro molares. El polímero es entonces sintetizado o modificado de manera que su superficie contenga grupos tioles (SH). Estudios

previos han mostrado que la AlbSNO transfiere NO a tioles de bajo peso molecular como la L-cisteína, tanto *in vitro* como *in vivo*; también se ha comprobado la transferencia y liberación de NO en sistemas con L-cisteína inmovilizadas en un polímero. Todo esto tiene como resultado una disminución en la adhesión plaquetaria [4,5, 14, 84, 85].

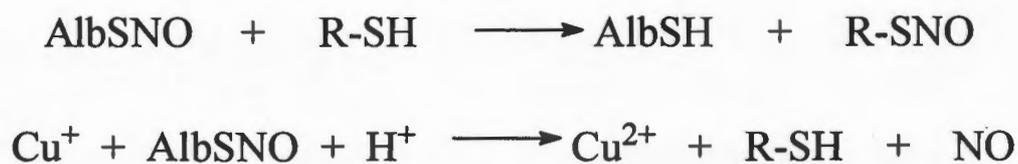


Figura 1.8. Mecanismo general para la transnitrosación de los tioles.

CAPÍTULO II. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiales

En la preparación de los poliuretanos segmentados (SPUBs), se utilizó como segmento flexible la poli (ϵ -caprolactona) diol (PCL diol), con un peso molecular de 1250 g/mol. El diisocianato utilizado fue 4,4'-metilen bis(ciclohexilisocianato) (HMDI) y como extendedor de cadena fueron utilizados 1,4-butanodiol (BDO) o 1,4-ditioeritritol (DTE). El catalizador utilizado fue el 2-etilhexanoato de estaño también conocido como octanoato de estaño. Todos los reactivos anteriores fueron de la marca Sigma-Aldrich. Como disolvente en la síntesis se utilizó dimetilformamida (DMF) marca Fluka y para la preparación de películas se empleó tetrahidrofurano (THF) marca J. T. Baker. Los reactivos fueron manipulados bajo atmósfera de nitrógeno para evitar su contaminación con agua del ambiente o en su defecto se secaron a 60°C bajo presión reducida y tamiz molecular.

Como poliuretano de referencia se utilizó Tecoflex[®] SG-80A dureza Shore 72A el cual fue adquirido de Thermedics (USA). Este es un poliuretano segmentado comercial tipo éter empleado para la fabricación de prótesis vasculares.

2.2. Preparación de SPUs

Se realizaron pruebas preliminares para establecer las condiciones de reacción, probándose diferentes métodos de polimerización (masa o disolución), tiempos, temperaturas y cantidades de disolvente. Finalmente la síntesis se llevó a cabo mediante una polimerización en dos etapas en

disolución a 60°C, con una relación molar HMDI:Extendedor:PCLdiol de 2.2:1:1 donde el extendedor puede ser BDO o DTE. Las cantidades de los reactivos se ajustaron para producir aproximadamente 10 g de polímero, la tabla 2.1 muestra las cantidades calculadas para las síntesis y los porcentajes de segmento rígido y flexible esperados. La reacción se llevó a cabo en un reactor de vidrio con agitación mecánica, colocado en una caja hermética y con flujo de nitrógeno seco.

En la primera etapa de la reacción, (formación del prepolímero) se hizo reaccionar la PCL diol con HMDI en 20 ml de DMF como disolvente y en presencia de 0.3% de octanoato de estaño durante 4 h. La segunda etapa (extensión) consistió en la reacción del prepolímero con BDO o DTE como extendedor de cadena durante 2 horas y a la misma temperatura. Una vez concluido el tiempo de reacción, el polímero fue precipitado en un exceso de agua destilada, y enjuagado varias veces para eliminar el diisocianato residual. Finalmente, el polímero fue secado a 50°C bajo presión reducida. Los poliuretanos preparados con BDO se denominaron SPUB y los preparados con DTE, SPUBSH.

Tabla 2.1. Formulaciones de los SPUs sintetizados.

	PCLdiol (g)	HMDI (g)	BDO (g)	DTE (g)	%SS	%SR
SPUB	6.6943	3.104	0.4833	—	65.11	34.89
SPUBSH	6.48	2.992	—	0.7997	63.08	36.91

SS= Segmento suave o flexible y SR= Segmento rígido.

Películas de los poliuretanos fueron preparadas por evaporación de disolvente. Los polímeros se disolvieron en THF y fueron vaciados en un molde de teflón cubierto con un embudo invertido con la finalidad de

Fueron ensayadas cinco probetas por muestra y los resultados fueron promediados.

2.3.3. Caracterización térmica

2.3.3.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los poliuretanos sintetizados fueron caracterizados mediante DSC utilizando un DSC-7 Perkin-Elmer. De 5 a 10 mg del polímero fueron encapsulados en charolas de aluminio y calentados de 40°C a 160°C con una rampa de calentamiento de 5 °C/min. y bajo una atmósfera de nitrógeno. Se registraron los termogramas del primer y el segundo calentamiento para cada muestra.

2.3.3.2. Análisis dinámico mecánico (DMA)

El análisis dinámico mecánico se realizó con un equipo DMA-7 Perkin Elmer en modo de extensión. Las muestras fueron estudiadas en un intervalo de -100 a 100°C con una rampa de calentamiento de 5 °C/min. y aplicando una fuerza estática de 60 mN, una fuerza dinámica de 40 mN y 1 Hz de frecuencia. Para este análisis se emplearon probetas con dimensiones aproximadas de 20 mm de longitud por 3 mm de ancho y 0.1 mm de espesor.

2.3.3.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

Las temperaturas de descomposición fueron determinadas mediante análisis termogravimétrico utilizando un equipo TGA-7 Perkin- Elmer. Los poliuretanos fueron calentados de 50°C a 550°C con una rampa de calentamiento de 10 °C/min. y bajo atmósfera de nitrógeno. La temperatura de

descomposición se reporta como al pico de descomposición después de obtener la derivada de la curva de masa (%) vs. temperatura.

2.4. Estudios de degradación química *in vitro*

2.4.1. Degradación hidrolítica y oxidativa a temperatura elevada

Películas de aproximadamente 2 cm² de los poliuretanos sintetizados y el poliuretano de referencia (Tecoflex[®]), fueron sometidos a degradación hidrolítica (HCl 2M ó NaOH 5M) u oxidativa (H₂O₂ al 30%) a reflujo (100°C) por 24 h de acuerdo a un procedimiento reportado previamente [17]. Las degradaciones se llevaron a cabo también en agua destilada para evaluar el efecto hidrolítico sobre los poliuretanos estudiados. El residuo fue filtrado, lavado, secado, pesado y caracterizado.

2.4.2. Degradación oxidativa con catálisis *in vitro*

Las muestras se colocaron en una solución de H₂O₂ al 20% y que contenía CoCl₂ 0.1M y se incubaron a 37°C por 15 días. La degradación se llevó a cabo en películas de aproximadamente 2.5 cm² para medir la pérdida de masa. La solución oxidante se cambió cada tres días para mantener constantes las condiciones de oxidación. Las películas se pesaron diariamente después de eliminar el agua superficial con un papel filtro.

Probetas para ensayos de tensión también fueron sometidas a este tratamiento, aunque éstas solo se retiraron de la solución hasta el final de los 15 días. Después de eliminarles el agua superficial se sometieron a ensayos de tensión tal y como se mencionó en la sección 2.3.2.

2.4.3. Caracterización de los poliuretanos degradados

La caracterización de las muestras degradadas se llevó a cabo por FTIR, DSC, TGA, microscopía electrónica de barrido (MEB) y difracción de rayos X (DRX).

Las muestras hidrolizadas de SPUB y SPUBSH fueron incorporadas a pastillas de KBr y las oxidadas fueron depositadas en las pastillas por evaporación de disolvente para su análisis por FTIR en modo transmitancia. Las muestras degradadas de Tecoflex[®] fueron analizadas utilizando el microscopio con reflectancia total atenuada (ATR por sus siglas en inglés).

La caracterización térmica se realizó bajo el mismo procedimiento, sección 2.2.3, que las muestras sin degradar.

La morfología de la superficie de los poliuretanos antes y después de degradar fue observada con un microscopio electrónico de barrido (MEB) JEOL JSM 6360LV.

Para analizar los cambios en la estructura cristalina de las muestras se utilizó un difractómetro de rayos-X Siemens D5000 con radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1.5416\text{\AA}$) con un paso de 0.02° y con un tiempo de 3 s en el intervalo 2θ de 5° a 60° .

2.5. Modificación superficial de poliuretanos segmentados con L-Cisteína

La modificación superficial se llevó a cabo en películas de SPUB y SPUBSH. Las películas fueron preparadas por evaporación de disolvente y cortadas en tamaños de aproximadamente 2 cm^2 .

La modificación superficial incluyó la introducción de grupos hidroxilos y la incorporación de L-Cisteína a través de un puente de glutaraldehído. La hidroxilación de SPUB se llevó a cabo por medio de una

hidrólisis alcalina según lo reportado en la literatura [77, 86]. La concentración de NaOH empleada fue 1 M y el tratamiento de 1 hora a una temperatura de 40°C. Una vez concluido el tiempo de hidroxilación las muestras fueron enjuagadas con abundante agua destilada. Pruebas preliminares mostraron que mayores concentraciones de NaOH y mayores tiempos de reacción no aumentaban considerablemente la eficacia de la modificación superficial. Por lo tanto las condiciones fueron seleccionadas para garantizar la modificación superficial sin degradar innecesariamente las muestras.

En la segunda etapa, las películas hidroxiladas se sumergieron en glutaraldehído al 25% por 15 min. Terminado este tiempo se enjuagaron nuevamente con abundante agua destilada y finalmente se sumergieron en una solución de L-Cisteína al 5% en buffer de fosfato (pH=7.2) por 20 h. Las películas así obtenidas fueron enjuagadas exhaustivamente con agua destilada y secadas a 50°C bajo presión reducida.

Los últimos dos pasos de la modificación (reacción con glutaraldehído y L-cisteína) también se aplicaron a los poliuretanos SPUBSH tomando en cuenta la presencia de grupos OH superficiales que quedaron sin reaccionar durante la síntesis del polímero.

2.5.1. Identificación de grupos hidroxilo superficiales

La hidroxilación de las películas de SPUB fue verificada mediante la técnica de ángulo de contacto por gota estática, por medio de un Contact Angle Meter CAM-Plus marca Tantec.

2.5.2. Identificación de azufre y grupos tioles

La identificación de grupos tioles se realizó tanto a las muestras de SPUB modificadas (SPUB-cys) como a las muestras SPUBSH sin modificar y modificadas (SPUBSH-cys).

La presencia de azufre fue determinada por microanálisis utilizando un EDX (Oxford Instruments, INCA Energy 200) acoplado a un microscopio electrónico de barrido JEOL, JSM 6360LV.

La prueba de Ellman se realizó para la identificación de los grupos tioles en su forma reducida. Para llevar a cabo esta prueba se preparó una solución acuosa del ácido 5,5'-ditiobis(2-nitro benzoico), conocido también como reactivo de Ellman (DTNB). El reactivo de Ellman fue disuelto en una solución tamponada de fosfato (1M, pH 7.4) a una concentración 0.001M. Las muestras modificadas y pesadas previamente se colocaron en viales con 1 ml de la solución y posteriormente se añadieron 3 ml de la solución tamponada de fosfato. Las muestras se mantuvieron bajo estas condiciones durante 2 h a temperatura ambiente (25°C) y posteriormente la absorbancia de la solución fue leída a 412 nm en un espectrofotómetro Beckman Coulter DU 650.

El contenido de grupos tioles se calculó utilizando la ecuación 1.

$$[SH] = \frac{A}{\epsilon l} \frac{V}{m_{muestra}} \quad [\text{ec. 1}]$$

donde $[SH]$ es la concentración de grupos sulfidrilos ($\mu\text{mol/g}$ de muestra seca), A es la absorbancia a 412 nm, V es el volumen de la solución (μl), $m_{muestra}$ la masa de la muestra deshidratada (g), ϵ es la absortividad molar de los grupos tioles en la reacción con DTNB ($13600 \mu\text{l}/\mu\text{mol cm}$), l la longitud de la celda por donde pasa el haz (1 cm) [87, 88].

2.6. Ensayos de hemocompatibilidad

Las pruebas de hemocompatibilidad se realizaron exclusivamente en los polímeros no degradados utilizando tubos recubiertos. De este modo se utilizaron SPUB, SPUBSH, SPUB-cys y SPUBSH-cys y Tecoflex® como material de referencia. La preparación de SPUB-cys y SPUBSH-cys fue modificada ya que se disminuyó la concentración de glutaraldehído de 25% a 0.625% en buffer de fosfato para evitar que la película se hinchara y se despegara del tubo. También se disminuyó la concentración de L-cisteína de 5% a 0.25% para evitar la precipitación de la cisteína en el fondo del tubo recubierto.

Para recubrir los tubos, estos se llenaron y vaciaron con soluciones de los polímeros en THF. La solución adherida a la superficie del tubo se dejó secar a temperatura ambiente y luego a temperatura más elevada con una pistola de aire caliente para una mejor adhesión del polímero al tubo de vidrio.

2.6.1. Determinación del tiempo de coagulación con sangre completa (Método de Lee-White)

El tiempo de coagulación (C_T) se determinó utilizando sangre completa sin anticoagulante y recién extraída de un donador sano, libre de medicación. Aproximadamente 2 ml de sangre se añadieron a los tubos recubiertos y se midió el tiempo de coagulación de manera visual [89]. El tiempo se empezó a contabilizar al inicio de la extracción de la sangre y se tomaron los tiempos del inicio y el final de la coagulación.

2.6.2. Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa)

Las pruebas de TTPa, se llevaron a cabo igualmente en tubos recubiertos con el poliuretano, pero en este caso se utilizó plasma sanguíneo. La muestra de plasma fue obtenida adicionando citrato de sodio como anticoagulante a la sangre y centrifugando a 3400 rpm por 15 s. El plasma obtenido no fue utilizado inmediatamente sino que fue almacenado hasta el momento de la prueba.

Para realizar la prueba se precalentó el reactivo de TTPa (Biopol, Trinity Biotech, Irlanda) y 0.1 ml de plasma por separado a 37°C durante 2 minutos. Posteriormente, 0.1 ml del reactivo fue mezclado con el plasma y se incubó durante 5 min. a 37°C. Luego se añadieron 0.1 ml de cloruro de calcio 0.025M, precalentado a 37°C y se registró el tiempo de formación del coágulo en segundos. Este análisis se llevó a cabo de manera visual.

2.6.3. Tiempo de protrombina (TP)

Para esta prueba se emplearon igualmente tubos de vidrio recubiertos con el poliuretano correspondiente y plasma sanguíneo obtenido como en el caso de la prueba TTPa.

En este caso, se precalentó el reactivo (Protrombina S) a 37°C, y se tomaron 2 ml para mezclarlo con 0.1 ml de plasma previamente precalentado a 37°C por 2 minutos. Una vez realizada la mezcla se tomó el tiempo en que se detectó de manera visual la formación del coágulo.

2.6.4. Caracterización superficial por MEB de muestras en contacto con sangre y plasma

Películas de los materiales sintetizados y modificados fueron cubiertas con sangre completa sin anticoagulante por 1 hora ó por 10 minutos en plasma tanto con el reactivo de TTPa como con el reactivo de TP. Una vez transcurrido el tiempo de contacto deseado se enjuagaron las películas con buffer de fosfato (pH 6.5) y se dejaron 30 minutos en glutaraldehído al 2.5%. Finalmente, se enjuagaron con buffer de fosfato nuevamente.

Las muestras fueron recubiertas con oro y observadas al microscopio electrónico de barrido (MEB).

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Caracterización de los poliuretanos

3.1.1. Caracterización espectroscópica

3.1.1.1. FTIR

La figura 3.1 muestra los espectros de infrarrojo para SPUB, SPUBSH y Tecoflex[®]. Los picos del Tecoflex[®] ya han sido bien establecidos por Guinot *et al.* [15]. Entre los picos principales de los SPU se pueden mencionar las bandas atribuidas a metilenos (3000-2800 cm^{-1}), los grupos uretano del segmento rígido (1529, 1228 cm^{-1}) y los grupos NH alrededor de 3323. Todas las bandas anteriormente mencionadas pueden encontrarse tanto en el Tecoflex[®] como en los poliuretanos sintetizados a base de policaprolactona (PCL) como segmento flexible, excepto la banda a 2792 cm^{-1} correspondiente al estiramiento simétrico de metilenos en poliéteres.

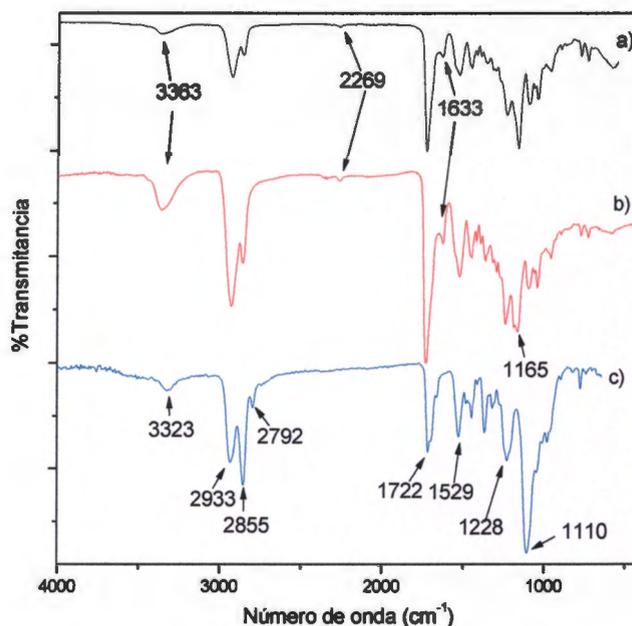


Figura 3.1. Espectros de IR. a) SPUB, b) SPUBSH y c)TECOFLEX[®].

La diferencia principal entre los poliuretanos sintetizados y el Tecoflex[®] se observó en el pico alrededor de 1722cm^{-1} ; en SPUB y SPUBSH el pico es mucho más intenso que en el Tecoflex[®]. Esto se debe a que en el Tecoflex[®] este pico corresponde a los carbonilos de los grupos uretano, mientras que en los poliuretanos sintetizados existen contribuciones a la banda del carbonilo, tanto del segmento flexible a base de PCL como de la señal de los carbonilos del grupo uretano. Por su parte, en el Tecoflex[®] el segmento flexible se puede observar por medio de un pico intenso a 1110cm^{-1} correspondiente a la vibración de los grupos éter del poli tetrametilenglicol (PTMG).

En el caso de SPUB y SPUBSH puede observarse un hombro junto a la banda de los carbonilos, a un número de onda más bajo (1636cm^{-1}) atribuida a los enlaces urea formados como reacción secundaria durante la síntesis. Igualmente la presencia de una pequeña banda alrededor de 2269cm^{-1} sugiere que algunos grupos diisocianato quedaron sin reaccionar.

En SPUBSH puede notarse que la banda de 3363cm^{-1} (correspondiente a los NH del enlace uretano) es ligeramente más ancha, lo que sugiere cierta cantidad de grupos OH que quedaron sin reaccionar, ya que estos grupos se presentan casi a la misma longitud que los NH pero con bandas más anchas.

Las reacciones de formación del poliuretano se describen en la figura 3.2. Puesto que los grupos SH pueden reaccionar de forma parecida a los grupos OH, existe la posibilidad de que SPUBSH contenga enlaces tiouretano. Sin embargo, la banda correspondiente al enlace C=S de los tiouretanos que aparece en 1165cm^{-1} , también se observó en los poliuretanos sin DTE, por lo que de estar presentes estos enlaces las bandas correspondientes se encuentran traslapadas.

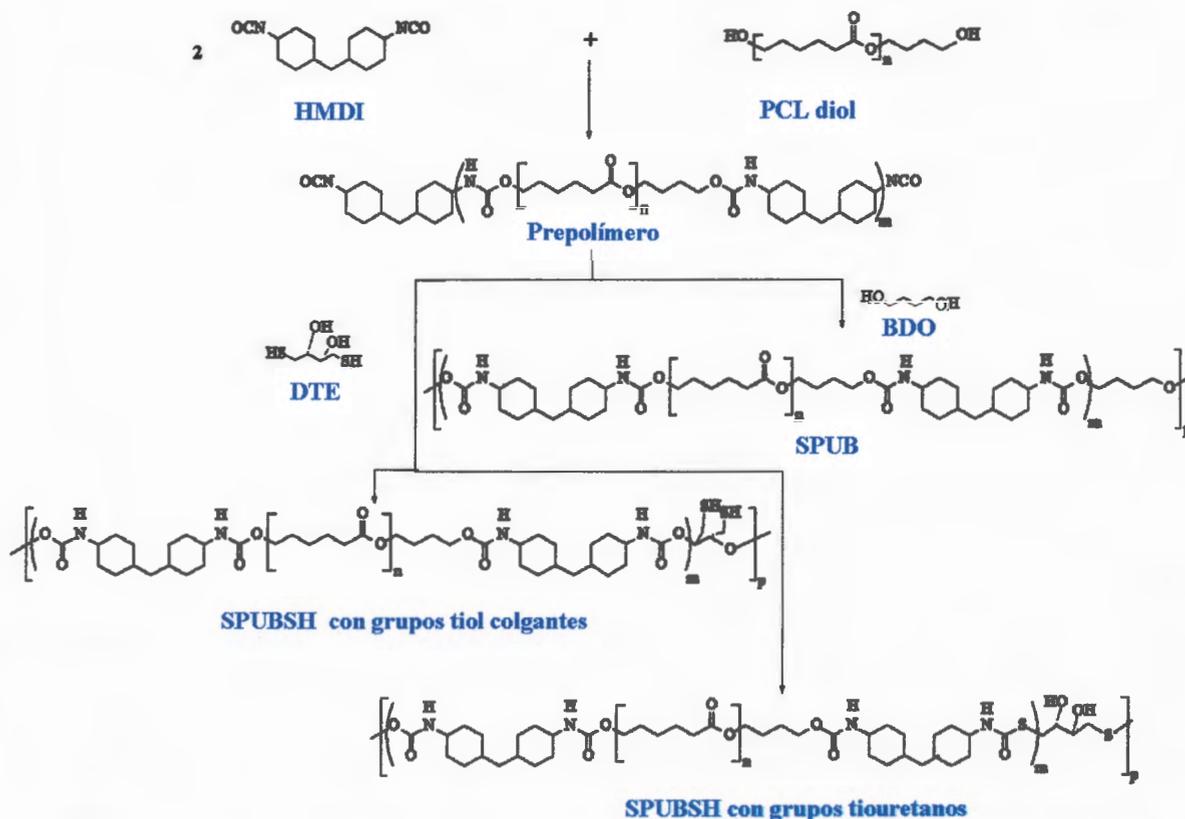


Figura 3.2. Mecanismos sugeridos para la formación de poliuretanos segmentados utilizando DTE o BDO como extendedores de cadena.

Los grupos tioles del DTE son grupos funcionales que pueden participar en la formación de tiouretanos en lugar de uretanos y esto puede causar una disminución en la cantidad de tioles disponibles. Sin embargo, esta reacción puede dar resultados favorables ya que proporcionaría una cantidad de grupos OH libres, los cuales aumentarían su hidrofiliidad. Estos grupos son importantes para aplicaciones en contacto con sangre ya que las superficies hidrofílicas presentan una menor cantidad de adsorción de fibrinógeno, una de las proteínas globulares más importantes que circulan en la sangre y que juegan un papel fundamental en la coagulación sanguínea, facilitando la adhesión y agregación de plaquetas [71, 72]. Adicionalmente,

estos hidroxilos pueden ser utilizados para injertar L-cisteína y de esa manera asegurar la presencia del azufre en forma de grupos tioles.

La presencia de grupos tioles no fue identificada por FTIR ya que el pico correspondiente a los enlaces S-H es de poca intensidad aún para el DTE puro (ver apéndice I). Además, la proporción del DTE es pequeña en comparación con el poliuretano, y esto hace que la absorción correspondiente sea imperceptible. También existe la posibilidad de que una pequeña cantidad de los SH hayan reaccionado con el HMDI, para formar tiouretanos. Por microanálisis se pudo observar un porcentaje de 1.8 a 2% p/p de azufre confirmando la reacción del DTE en la síntesis de SPUBSH. Para asegurar la presencia de grupos tioles, se analizaron películas de SPUBSH por medio del reactivo de Ellman, obteniéndose una cantidad de 1.0628 μmol de grupos tioles en la superficie por gramo de muestra.

3.1.1.2. ^1H RMN

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica de SPUB y SPUBSH fueron casi iguales como se muestra en la figura 3.3. La asignación correspondiente es a= 4.1-3.98 ppm, CH_2 unido a oxígeno en el poliol y butanodiol; b= 1.7-1.5 ppm, CH_2 de la cadena principal del poliol, butanodiol y el metileno central del HMDI; c= 1.43-1.3 ppm, CH_2 del carbono central en el poliol y del CH_2 en los ciclos del HMDI; d= 2.4-2.23 ppm, CH_2 unido a carbonilo del grupo ester; e= 4.23-4.17 ppm, NH del uretano; f= 3.7-3.3 de CH. Los picos más intensos son los correspondientes la PCL lo que era esperado tomando en cuenta la mayor proporción en la que se encuentra el segmento flexible, además que los picos del segmento flexible, se encuentran

también en el segmento rígido como se observa en el apéndice II. El enlace uretano fue confirmado por la presencia del pico de NH.

En lo que respecta a SPUBSH, la única diferencia observada con respecto a SPUB se encontró en el intervalo de 3.3-3.6 ppm; los picos que se observaron en este intervalo pudieran corresponder a CH₂ unido a azufre.

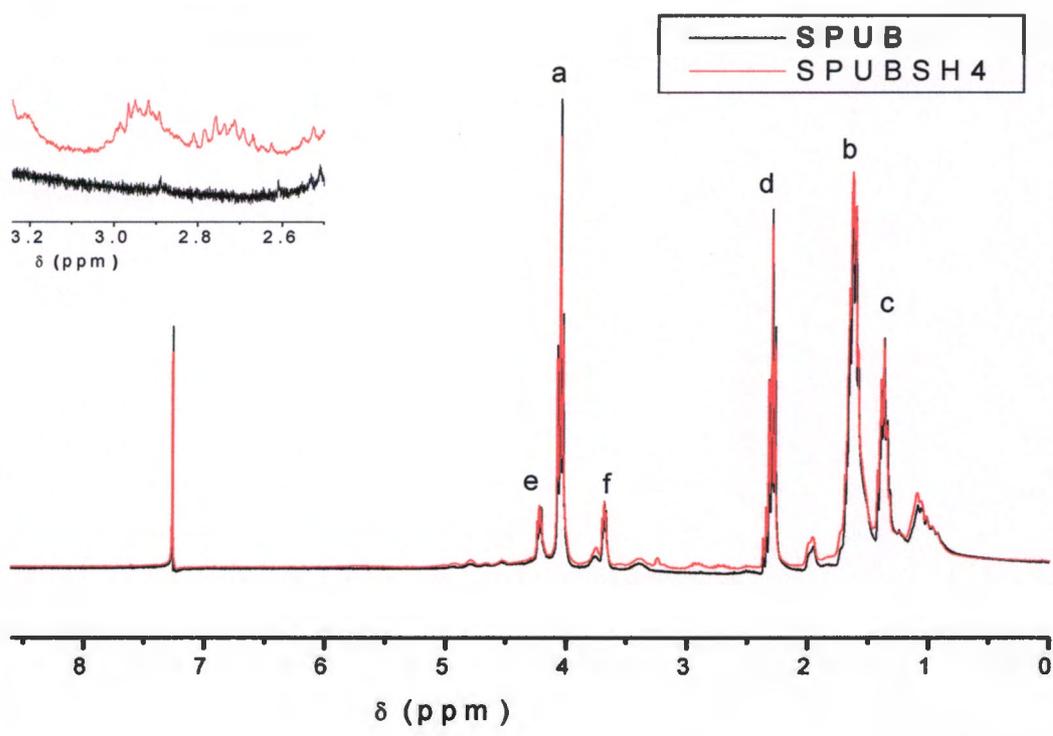
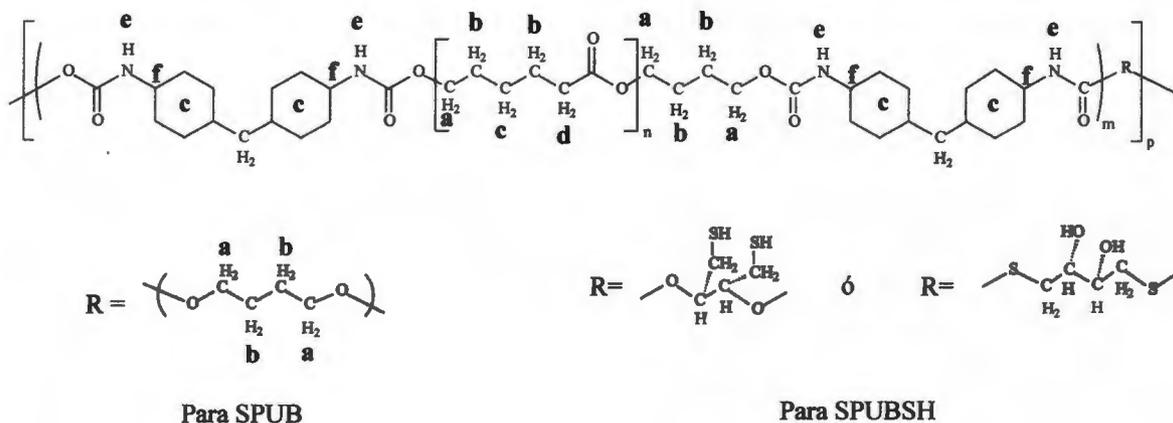


Figura 3.3. Espectros de ¹H RMN para los poliuretanos segmentados sintetizados.

3.1.2 Caracterización mecánica

En las pruebas de tensión, todos los poliuretanos analizados mostraron un comportamiento elastomérico (Figura 3.4). Entre los polímeros sintetizados, fueron las muestras de SPUB las que mostraron mayor módulo elástico (3.4 ± 0.38 MPa) y mayor resistencia a la tensión (31.3 ± 4.4 MPa) ya que el SPUBSH mostró un modulo elástico de 0.94 ± 0.08 MPa y una resistencia a la tensión de 5.19 ± 0.72 MPa. Sin embargo, los SPUBSH presentaron un mayor porcentaje de deformación ($958\% \pm 103$) mientras que la deformación en SPUB fue de alrededor de $678\% \pm 44$. Por su parte, el Tecoflex® mostró una resistencia a la tensión de 25.88 ± 4.68 MPa, un modulo elástico al 100% de 4.32 ± 0.18 MPa y una deformación a la ruptura de $830\% \pm 106$.

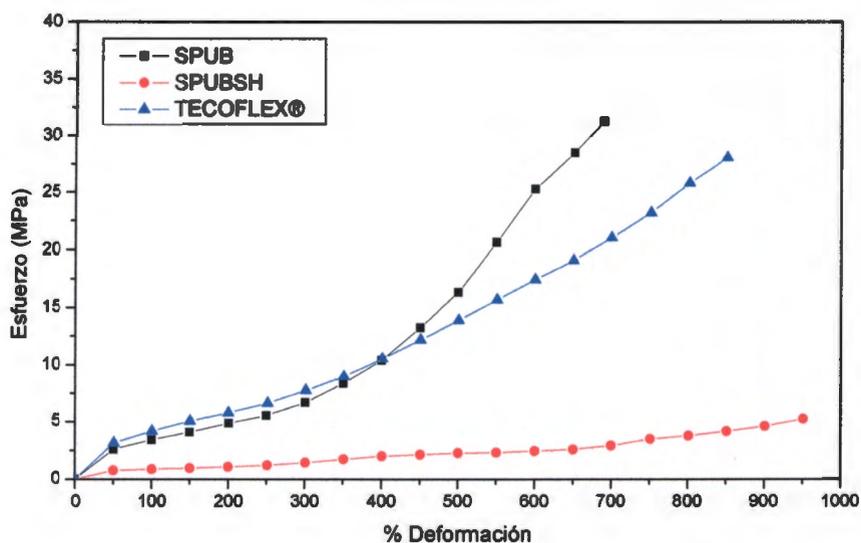
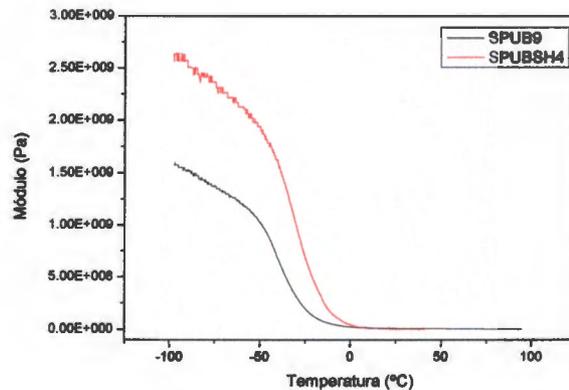


Figura 3.4. Curvas esfuerzo-deformación de los SPUs sintetizados y Tecoflex®.

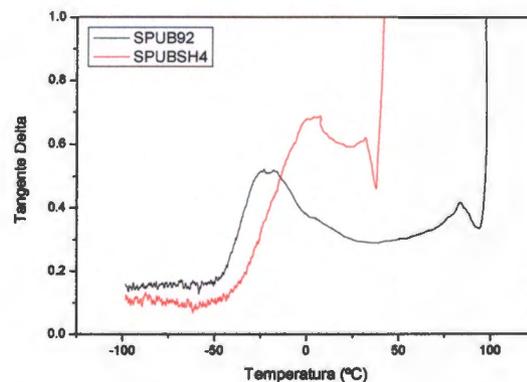
3.1.3. Caracterización térmica

3.1.3.1. Análisis mecánico dinámico (DMA)

Mediante análisis mecánico dinámico se observó una mayor rigidez del SPUBSH comparado con SPUB a muy bajas temperaturas tal y como lo muestran sus módulos de almacenamiento en la figura 3.5. En el caso de la transición α correspondiente a la Tg de los segmentos flexibles, esta se observó para el SPUB a -23°C mientras que para SPUBSH se observó a 4°C . Esto nos muestra que la presencia de DTE afecta la flexibilidad del polímero, posiblemente por la presencia de PCL cristalina.



a)



b)

Figura 3.5. Efecto de los dos diferentes extendedores de cadena sobre a) Módulo de almacenamiento y b) Tangente delta, en SPUB y SPUBSH

Una segunda transición asociada a los segmentos rígidos puede observarse a 83°C en SPUB y a 31°C en SPUBSH, esta última temperatura podría deberse a la presencia de grupos tiouretano menos rígidos que los uretano de SPUB.

3.1.3.2. Análisis Termogravimétrico (TGA)

Los termogramas de TGA mostraron diferentes temperaturas de descomposición (T_d) para los poliuretanos analizados y el poliuretano comercial (ver figura 3.6). En el caso del Tecoflex[®] se observaron dos caídas, una entre 300°C y 400°C que ha sido relacionada con la descomposición de los segmentos rígidos y la otra a 450°C la cual se ha relacionado con los segmentos flexibles. Algunos autores han relacionado la caída entre 250-300°C con la depolimerización de grupos uretano [2, 21, 30, 90].

Para SPUB y SPUBSH no se pudo establecerse la misma relación ya que la T_d de la PCL es muy cercana a la de los segmentos rígidos. La T_d de la PCL pura se ha reportado a 260°C al 1% de descomposición [54] y una degradación máxima alrededor de los 388°C [91].

En SPUB se apreciaron dos caídas, la primera entre 250°C y 400°C, con un alto porcentaje de descomposición en este intervalo de temperatura por la descomposición de ambos segmentos, rígidos y flexibles. Después de la primera descomposición, la baja volatilización de monómeros puede conducir a la formación de urea, por lo que a 450°C se observó una segunda caída ya que se alcanzó la descomposición de la totalidad de los grupos uretano más la descomposición de la urea formada como reacción secundaria durante la síntesis de los poliuretanos.

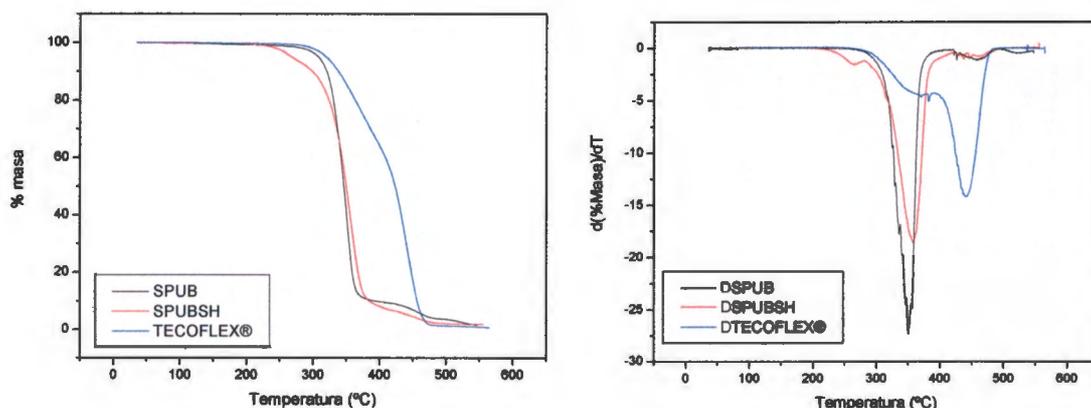


Figura 3.6. Termogramas de TGA de los SPUs sintetizados y del Tecoflex®. a) Pérdida de masa y b) Primera derivada

El comportamiento de SPUBSH fue similar a SPUB; sin embargo SPUBSH presentó tres caídas, la primera a una baja temperatura (a partir de 250°C) que puede ser relacionada con la descomposición del DTE; la segunda caída correspondiente a la PCL y los segmentos rígidos que se encontró ligeramente desplazado a una mayor temperatura de descomposición con respecto al pico correspondiente en SPUB. Finalmente, la tercera caída se presentó en el mismo intervalo y porcentaje de descomposición que en el caso de SPUB.

3.1.3.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los análisis por DSC fueron realizados en un intervalo de 40-160°C, ya que en estudios preliminares se ha reportado la descomposición de los poliuretanos alrededor de 160-180°C aunque por TGA se observó que empiezan a perder masa hasta los 200°C. Guignot *et al.* [15] por su parte realizaron estudios por FTIR de Tecoflex® calentándolo de temperatura ambiente hasta los 200°C, y observaron que los grupos isocianato empezaban

a aparecer alrededor de 130-140°C, mostrando simultáneamente una disminución en el peso molecular.

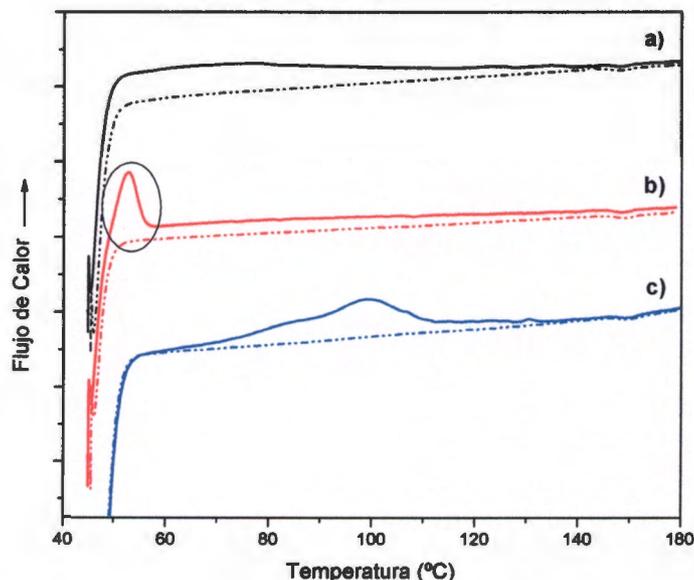


Figura 3. 7. Termogramas de DSC para a) SPUB, b) SPUBSH y c) TECOFLEX®; en primer calentamiento (línea continua) y segundo calentamiento (línea punteada).

En la figura 3.7 se pueden observar los termogramas de DSC de los poliuretanos sintetizados y del Tecoflex®. En el caso de SPUBSH es evidente un pico de fusión correspondiente a la PCL a 52°C, el cual desaparece en la segunda corrida. En el SPUB no se observó pico de fusión indicando que la PCL se encuentra en estado amorfo y dispersa entre los segmentos rígidos. En el termograma del Tecoflex® es mas visible una transición endotérmica característica en los poliuretanos segmentados y que se ha atribuido a un reacomodo de los dominios (rígidos y flexibles) durante el calentamiento. Esta transición desaparece en el segundo ciclo de calentamiento ya que el rápido enfriamiento no permite a las cadenas poliméricas ordenarse nuevamente [67].

3.2. Estudios de degradación química *in vitro*

Los estudios de degradación *in vitro* se llevaron a cabo en medios químicos muy agresivos para evaluar el efecto de estos en el mecanismo de degradación de los poliuretanos.

3.2.1. Caracterización de poliuretanos degradados

3.2.1.1. Pérdida de masa

Los polímeros biodegradables analizados están formados por dos bloques de polímero con muy diferente biodegradabilidad. Por un lado, se ha reportado que los segmentos de PCL son mucho más degradables que los segmentos rígidos mientras que por otra parte la cristalinidad tiene un efecto negativo en la degradación [92]. La presencia de PCL cristalina observadas en SPUBSH no interfirió la degradación pues esta se llevó a cabo muy por encima de su punto de fusión.

Asimismo, se observó una gran diferencia entre la degradación química del Tecoflex[®] y los poliuretanos biodegradables. Aunque en el primero se esperaba una degradación preferentemente oxidativa no se observó gran diferencia con respecto a su degradación en medios hidrolíticos, pues temperaturas arriba de 70°C favorecieron la hidrólisis de los enlaces uretano [94]; en el caso de SPUB y SPUBSH se observó una mayor degradación por vía hidrolítica (HCl y NaOH).

La degradación por vía ácida y alcalina produjo una pérdida de masa de entre 50% y 80% en SPUB y SPUBSH como puede observarse en la tabla 3.1. El residuo obtenido por la degradación consistió de hojuelas quebradizas e insolubles que formaban polvos fácilmente. Los residuos de la degradación

alcalina, tanto para SPUB como para SPUBSH, presentaron un mayor espesor que los fragmentos recuperados de la degradación ácida.

Tabla 3.1. Pérdida de masa (%) por degradación de los poliuretanos a 100°C por 24h.

Poliuretano	Tipo de Degradación			
	<i>Neutra (Agua destilada)</i>	<i>Acida</i>	<i>Alcalina</i>	<i>Oxidativa</i>
SPUB	1.46±0.08	63.42±7.6	82.7±2.6	13.08±3.3
SPUBSH	6.15±1.35	87.23±4.7	52.65±13.2	19.07±7.0
TECOFLEX®	0.63±0.3	1.66±0.66	1.48±1.62	2.16±1.47

Por otro lado, se observó que la degradación oxidativa condujo a pérdidas de masa de 13% y 19% para SPUB y SPUBSH respectivamente. La degradación en agua destilada a 100°C se realizó como control experimental para separar el efecto hidrolítico del medio acuoso.

Como se esperaba el Tecoflex® mostró una baja degradación en medios ácidos y alcalinos en comparación con los poliuretanos con PCL, pues el segmento flexible tipo éter del Tecoflex® se degrada principalmente por vía oxidativa. Pese a esto la pérdida de masa del Tecoflex® en un medio oxidante fue menor que la experimentada por SPUB y SPUBSH, mostrando que aunque el principal mecanismo de degradación de estos últimos es vía hidrolítica también son muy susceptibles a la degradación oxidativa, en especial en el caso de SPUBSH.

El estudio de los biomateriales bajo estas condiciones de degradación acelerada son muy importantes ya que al entrar éstos en contacto con un tejido

biológico, las actividades hidrolíticas y oxidativas pueden ser incrementadas y de manera local, similares a las estudiadas. Por otro lado, se ha observado que la naturaleza química del material puede preferir entre el mecanismo de degradación hidrolítico u oxidativo [41].

3.2.1.2 Espectroscopía de IR

El efecto de la degradación en la estructura química de los poliuretanos fue analizado por medio de FTIR (figura 3.8). Los espectros mostraron una gran disminución en la banda de 1728 cm^{-1} correspondientes a los carbonilos de los grupos éster de la PCL durante la hidrólisis ácida o alcalina. Durante la hidrólisis alcalina de SPUBSH, se observó la desaparición casi completa del pico de los carbonilos, tanto del segmento flexible como de los carbonilos del grupo uretano.

Los espectros de IR mostraron que durante la degradación oxidativa de SPUBSH y SPUB, no se afectaron los segmentos flexibles a base de policaprolactona ya que en ambos se siguió observando un pico intenso correspondiente a los carbonilos del éster. Sin embargo, la degradación oxidativa si afectó los enlaces urea, observándose una disminución en la banda 1641 cm^{-1} asignada a estos enlaces. Además se observó que el pico de NH era más ancho lo que indica la formación de grupos OH que absorben a la misma longitud de onda.

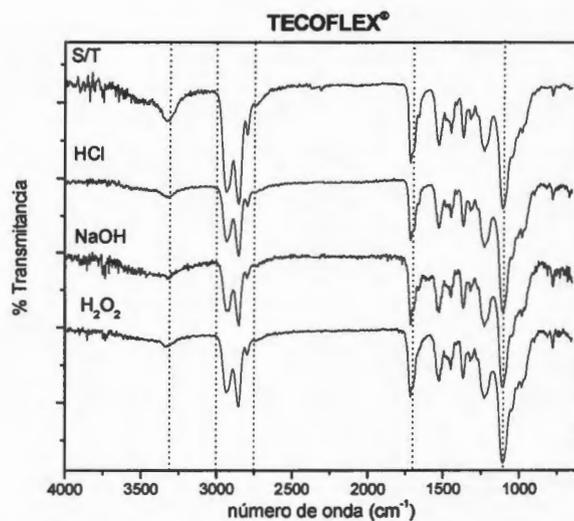
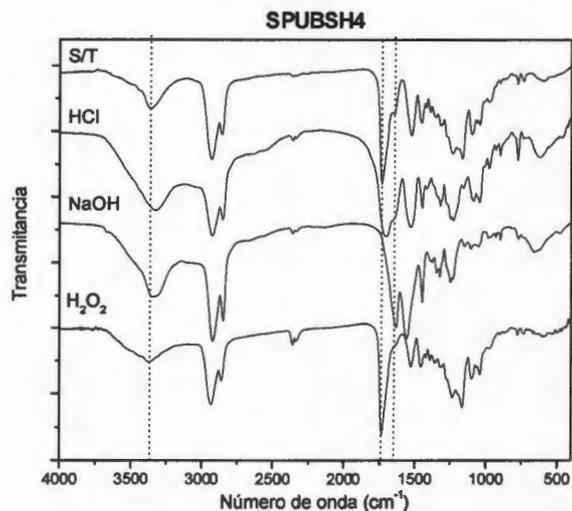
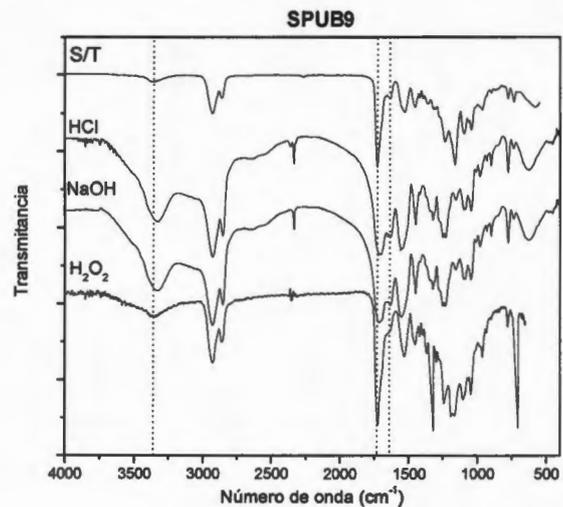


Figura 3.8. Espectros de IR de poliuretanos degradados.

La degradación oxidativa en poliuretanos tipo éter ha sido estudiada ampliamente [17, 42, 44, 48, 93]. Para el análisis de las muestras degradadas de Tecoflex[®] se utilizó FTIR en modo ATR, pues como se observa en las micrografías (Figura 3.13) la degradación fue superficial. Por lo tanto, esta técnica nos puede dar una mayor información sobre los cambios en la estructura química de la superficie del Tecoflex[®] degradado.

En los espectros de infrarrojo del Tecoflex[®] degradado, se pudo observar una disminución en el pico a 3317cm^{-1} correspondiente al estiramiento de -NH- de los grupos uretano. El pico correspondiente a los carbonilos del uretano se vió ligeramente afectado en el caso de la hidrólisis alcalina. Aunque los enlaces uretano son hidrolizables, el carácter hidrofóbico de los segmentos rígidos no permite la penetración del agua en esta parte del material y por lo tanto este segmento es más difícil de degradar. Kim *et al* [95], mostraron que los poliuretanos a base de diisocianatos menos rígidos como HDI (hexametileno diisocianato) presentaron una mayor degradación hidrolítica, que los poliuretanos con segmentos rígidos a base de HMDI.

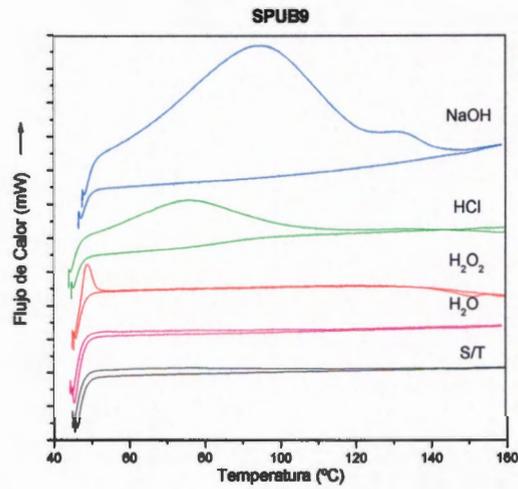
Las muestras analizadas por FTIR del Tecoflex[®] oxidado, mostraron una disminución en los picos correspondientes a la vibración de los metilenos de acuerdo con estudios previos [96]. Se ha sugerido que el mecanismo principal para la degradación del segmento flexible tipo éter consiste en la escisión por medio de la abstracción del metileno adyacente al grupo éter produciendo hidroperóxidos y hemiacetales los cuales, sin embargo, son extremadamente inestables a temperaturas superiores a los 60°C [15, 44, 97]. Guignot *et al* [15] mostraron una disminución en el pico de los metilenos

después de un tratamiento por 30 min. a 200°C y confirmaron por GPC la degradación del Tecoflex[®].

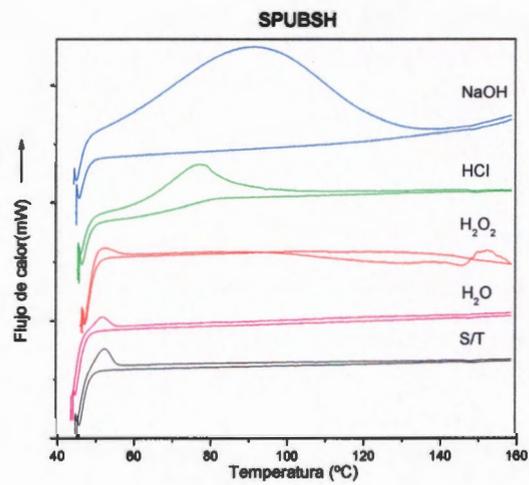
3.2.1.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En las muestras de SPUB y SPUBSH degradadas en medios ácidos y alcalinos se observó un pico, muy ancho, durante el primer calentamiento (figura 3.9). Este pico fue más ancho en muestras degradadas con hidróxido de sodio que en el caso de las muestras degradadas con ácido clorhídrico. Esta transición endotérmica puede atribuirse al hidróxido de sodio que quedó atrapado en las muestras degradadas y a la formación de compuestos hidrofílicos los cuales absorben grandes cantidades de agua.

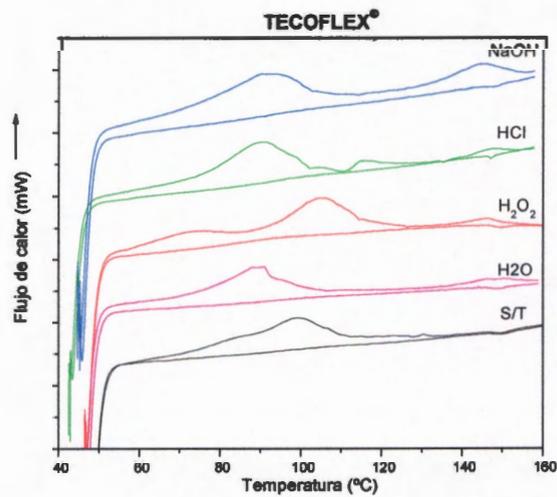
Durante la segunda corrida, principalmente en las muestras degradadas por vía ácida, se observó la presencia de una T_g que puede atribuirse al segmento rígido. La presencia de esta T_g se esperaba ya que al degradarse los segmentos flexibles habría un aumento en los segmentos rígidos. Estudios reportados en la literatura muestran que la T_g de los segmentos rígidos es más fácil de visualizar en poliuretanos con altas proporciones de segmentos rígidos mientras que a bajos contenidos de segmentos rígidos no es posible observarla [30]. Esta T_g también fue observada en PU modelo sintetizados en una sola etapa (HMDI-BD) sin el segmento flexible (ver Apéndice II).



a)



b)



c)

Figura 3.9. Termogramas de DSC para las muestras de SPUs sin degradar y degradadas.

Por otro lado, la presencia de un pico de fusión fue observada durante la degradación oxidativa de los SPUs sintetizados. Este pico fue asignado a la fusión de la PCL, indicando que el segmento flexible tanto de SPUB como de SPUBSH no fue afectado por el medio. Además en la degradación en agua destilada del SPUB, no se observó la aparición del pico cristalino, sugiriendo que el pico de fusión presente en las muestras oxidadas no era ocasionado por el tratamiento térmico, sino porque la degradación oxidativa favorece el ordenamiento de la PCL en estructuras cristalinas posiblemente por una disminución en el peso molecular.

3.2.1.4 Análisis termogravimétrico (TGA)

Los termogramas obtenidos por TGA del SPUB sin degradar se muestran en la Figura 3.10. En estos se pudo observar que este polímero es estable térmicamente hasta los 350°C donde empieza tanto la degradación térmica de la PCL, como la de los segmentos rígidos. Posteriormente, se observó otra pequeña pérdida de masa cerca de los 450°C.

En el análisis por TGA de los residuos de la degradación alcalina se observó una pequeña pérdida de masa a temperaturas menores de 100°, posiblemente por la eliminación de agua, ya que los grupos funcionales producto de la hidrólisis son hidrofílicos, además que pudo quedar NaOH atrapado en los poros de las muestras degradadas. Posteriormente, tanto en las muestras degradadas en medio ácido como alcalino se observó una pérdida de masa entre 150°C y 300°C por la eliminación de moléculas de bajo peso molecular. A continuación fue observada una pérdida de masa, correspondiente a la degradación de los segmentos rígidos y la PCL residual.

En esta etapa (entre 300°C y 400°C) el porcentaje de pérdida de masa fue menor que en las muestras no hidrolizadas, pues la PCL que se descompone en este intervalo de temperatura es degradada por la hidrólisis tanto ácida como alcalina, tal y como fue observado en los espectros de FTIR. En la última etapa se observó una mayor proporción de material degradado a 450°C, probablemente debido a grupos alofanato, siendo más resistentes a la degradación térmica y a la degradación hidrolítica.

El análisis por TGA de los residuos de las muestras degradadas, mostró que la degradación oxidativa ocasiona una pequeña disminución en la temperatura de inicio de la descomposición lo que se asignó a una disminución en los pesos moleculares de las cadenas poliméricas.

Los termogramas de SPUBSH y de los residuos de sus degradaciones fueron semejantes a los de SPUB excepto alrededor de 250°C. La descomposición a esta temperatura fue atribuida al DTE en las muestras sin degradar, pero en las muestras degradadas por hidrólisis alcalina y oxidativa ya no se observa pérdida de masa a esta temperatura, mientras en los residuos de la hidrólisis ácida encontramos un porcentaje de descomposición considerable lo que nos indica que el DTE resiste la degradación en medio básico.

El análisis por TGA para el Tecoflex[®] degradado mostró un comportamiento diferente que el de SPUB y SPUBSH. Esto es, la pérdida de masa durante la degradación *in vitro* fue pequeña, ya que no se esperaba una variación importante en la proporción de los segmentos que fuera notable en el análisis por TGA. Las muestras de Tecoflex[®] degradadas presentaron una ligera disminución en la temperatura de descomposición, que puede ser

explicada por una disminución del peso molecular ocasionada por la escisión de las cadenas.

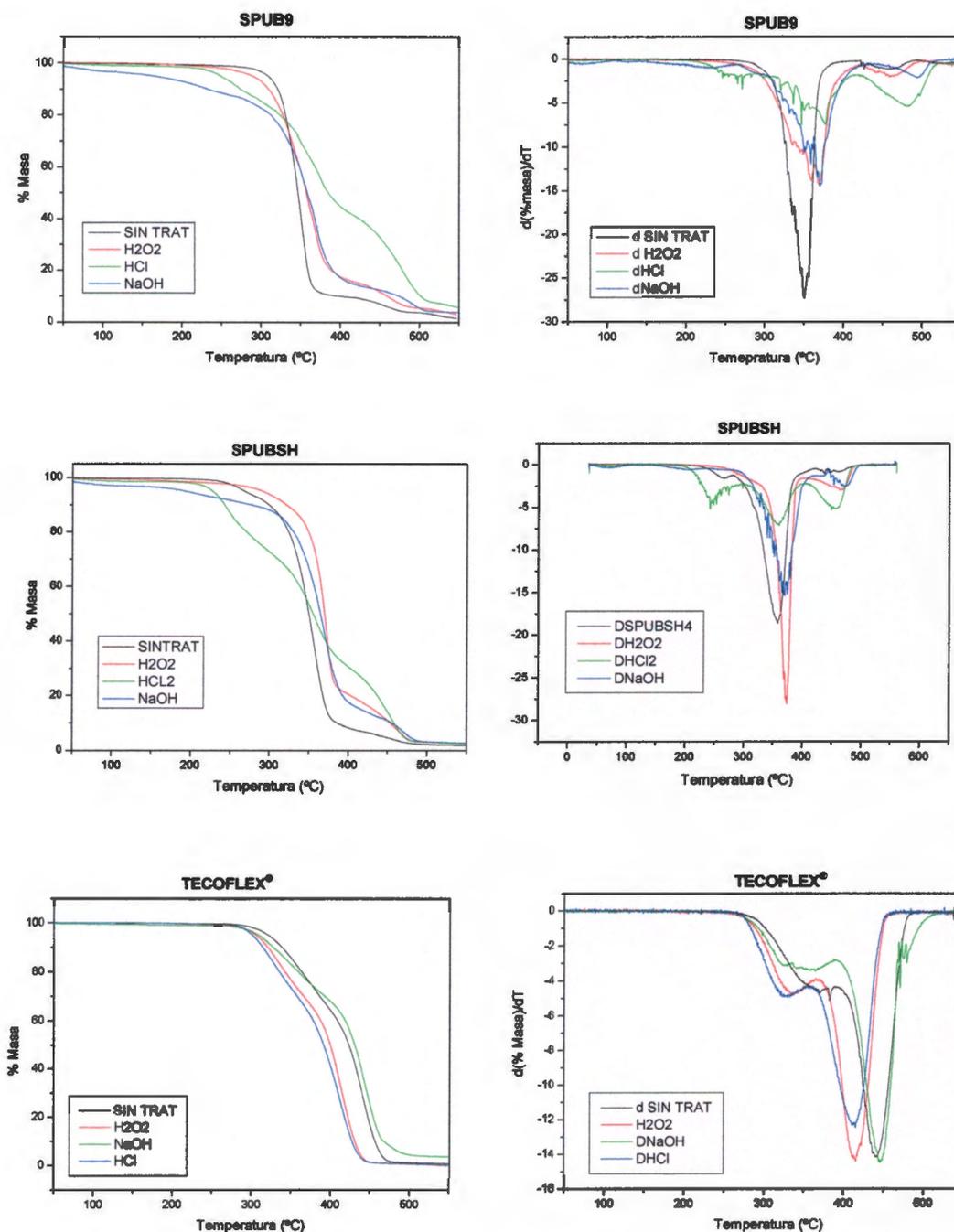


Figura 3.10. Termogramas de TGA del SPUB, SPUBSH y Tecoflex® sin degradar y de los residuos de las diferentes degradaciones.

3.2.1.5. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

El análisis por MEB fue muy importante para conocer la morfología de los poliuretanos degradados, así como mayores detalles sobre el mecanismo de degradación de los poliuretanos. De esta manera se pudo observar una gran diferencia entre los poliuretanos a base de PCL y el poliuretano comercial Tecoflex[®] (figuras 3.11- 3.13).

La principal razón de estas diferencias en la degradación la constituye la diferente hidrofiliidad de los materiales. El Tecoflex[®] muestra un carácter hidrofóbico (ángulo de contacto con el agua de 87°), mientras que los poliuretanos biodegradables muestran una menor hidrofobicidad (72.6°) por la presencia de la policaprolactona. Por lo tanto, el Tecoflex[®] impide que el medio degradativo penetre al interior del polímero y por lo tanto su degradación es solo superficial como se puede ver en la figura 3.13.

En el caso de los poliuretanos con PCL (SPUB y SPUBSH) se pudo observar la formación de estructuras porosas atribuidas en parte a la menor hidrofobicidad de estos materiales, lo que permitió la penetración de los medios degradativos al interior del material como se observa en las figuras 3.11 y 3.12.

La formación de las estructuras porosas fue más evidente en el caso de la degradación con NaOH (ver figura 3.12). Esto se puede atribuirse a una degradación más selectiva, ya que hay una mayor degradación de la PCL lo que se evidencia por la desaparición de la banda de carbonilos por FTIR (figura 3.8). La literatura muestra que pH básicos y altas temperaturas favorecen la degradación de la PCL en medio acuoso [16].

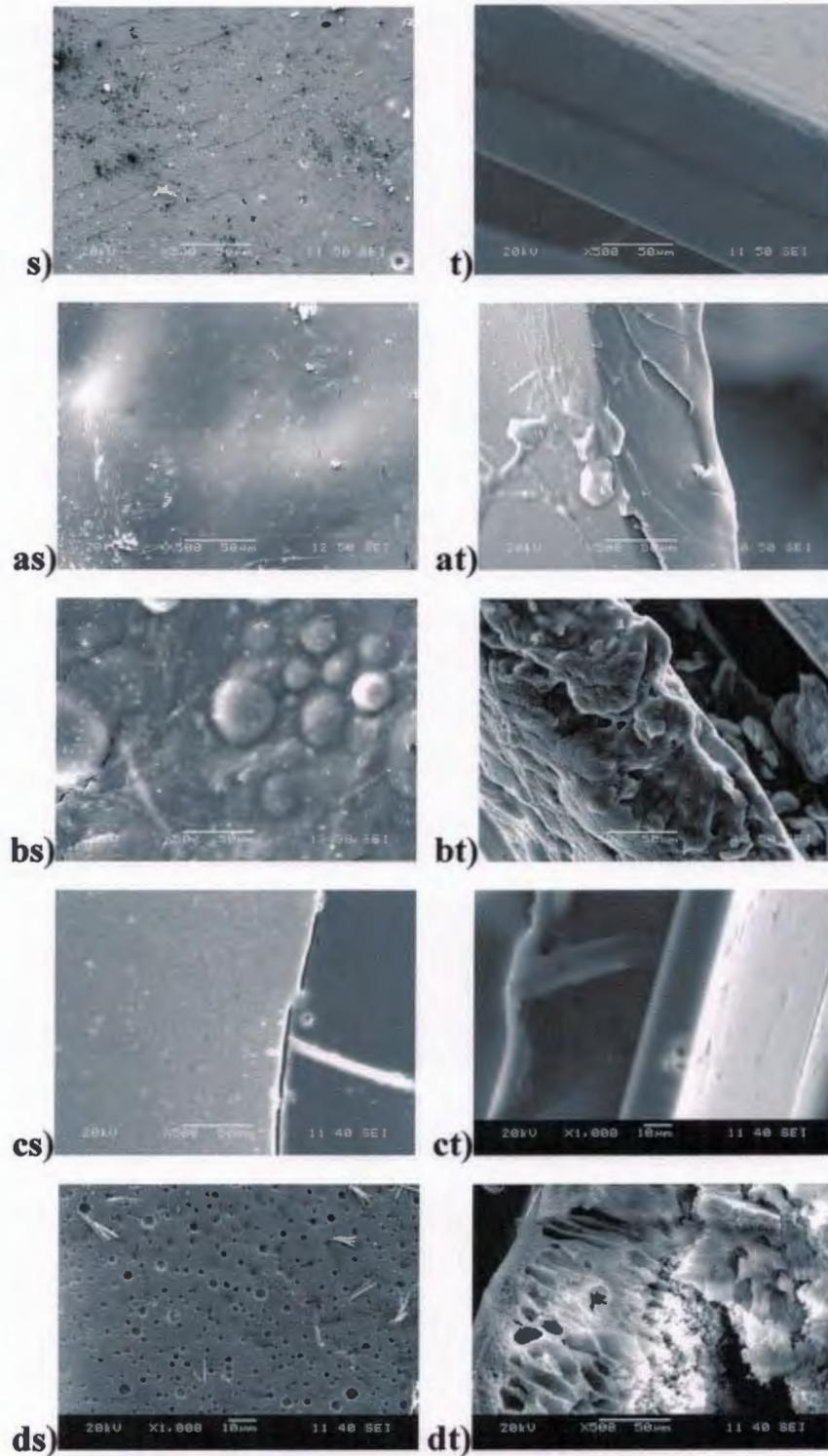


Figura 3.11.- Películas de SPUB sin degradar vista superficial(s) y transversal (t); degradadas en medio: neutro (as y at), oxidativo (bs y bt), ácido (cs, ct) y alcalino (ds y dt).

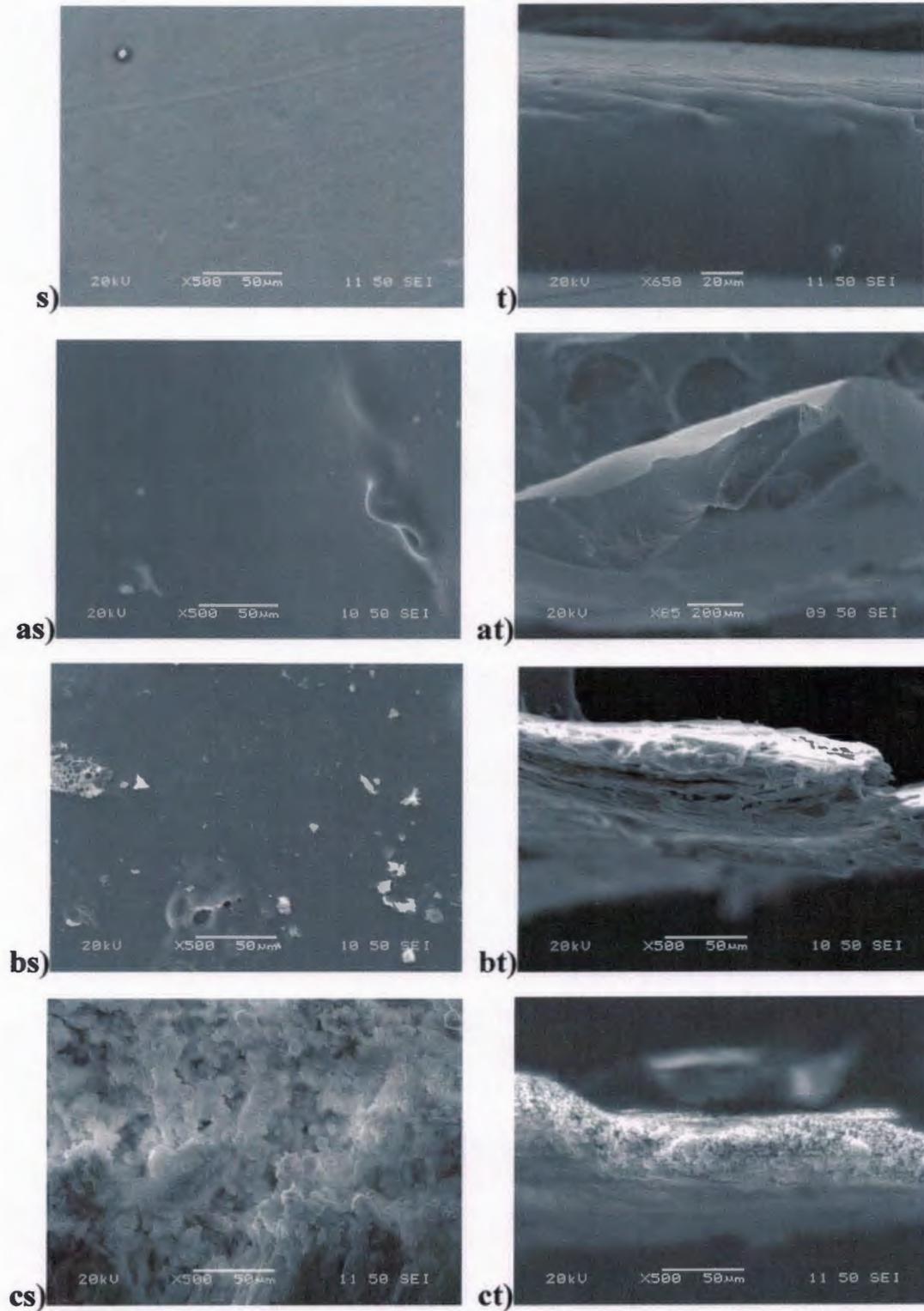


Figura 3.12.- Películas de SPUBSH sin degradar vista superficial (s) y transversal (t); degradadas en medio: neutro (as y at), ácido (bs, bt) y alcalino (cs y ct).

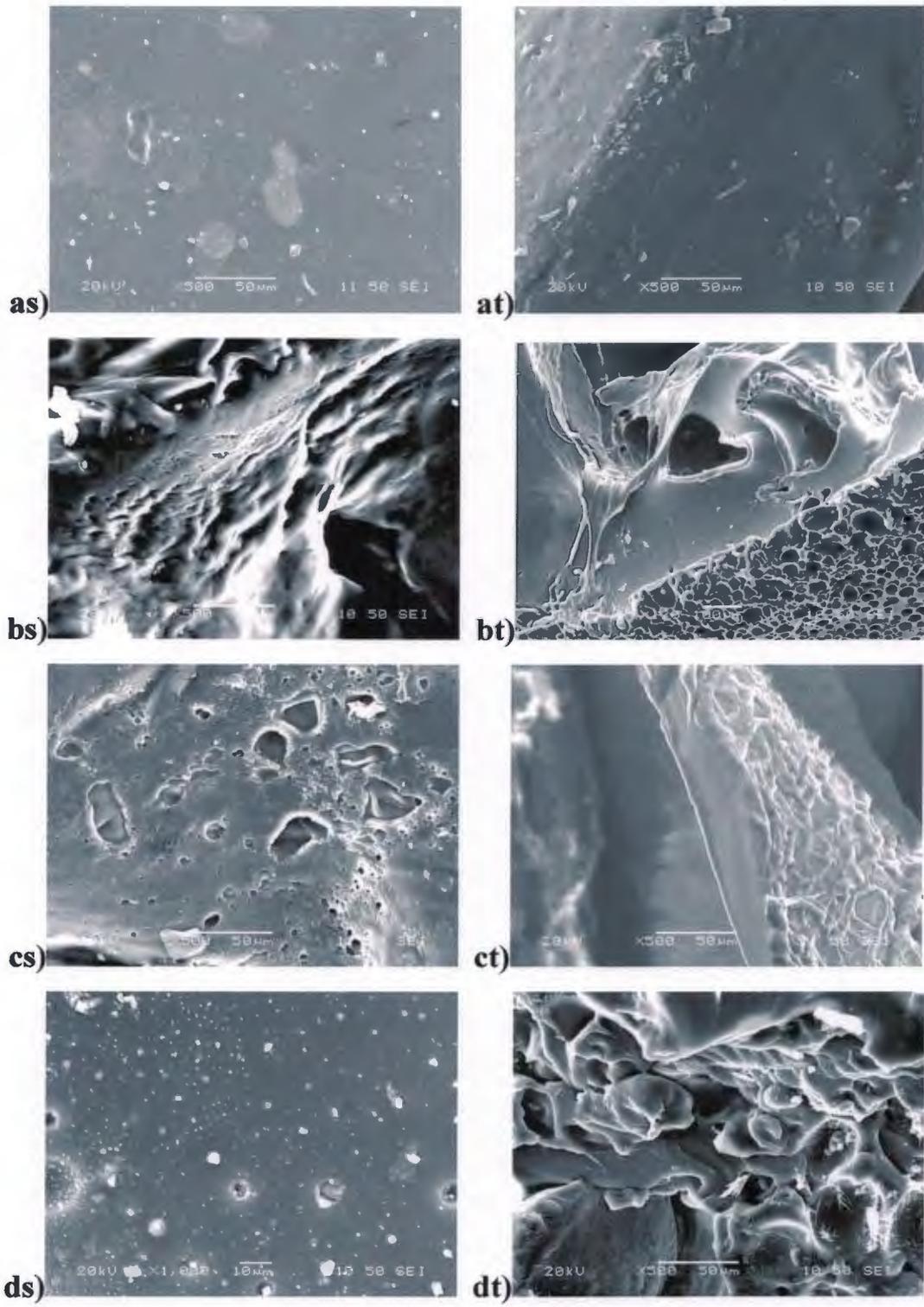


Figura 3.13.- Degradación del Tecoflex® en medio: neutro (as y at), oxidativo (bs y bt), ácido (cs, ct) y alcalino (ds y dt).

La microestructura de las muestras de SPUBSH degradadas fue similar a SPUB pero en todos los casos se observó una disminución en el espesor de los residuos de las películas degradadas. Aunque se observó un alto porcentaje de pérdida de masa en SPUBSH degradado en HCl, sólo se observaron poros aislados mostrando una mayor degradación por erosión.

Las muestras oxidadas de SPUBSH no fueron analizadas por MEB porque el residuo de la degradación resultó ser una pasta difícil de manejar.

3.2.1.6. Difracción de rayos X (DRX)

La figura 3.14 muestra los difractogramas para las muestras sin degradar y degradadas. En el caso de SPUB se observó un halo amorfo con un máximo a $2\theta = 20$ grados. En los difractogramas se observó que después de la degradación oxidativa del SPUB, las fases cristalinas de PCL sobresalieron ($2\theta = 21.5$ y 23.6) tal y como ha sido reportado para la PCL pura [11]. Esto confirma, lo observado en los termogramas de DSC donde se observó un pequeño pico de fusión alrededor de 52°C , puesto que un medio altamente oxidante, degrada preferentemente los segmentos rígidos facilitando el reacomodo de los segmentos flexibles y la formación de la fase cristalina.

En el difractograma de SPUBSH sin degradar se puede observar el pico correspondiente a la PCL cristalina como se observó también por DSC, sin embargo en el caso del SPUBSH degradado en medio oxidativo no pudo ser analizado por DRX pues la muestra recuperada era un sólido ceroso que no formaba película; aunque por DSC se observó el pico de fusión de la PCL.

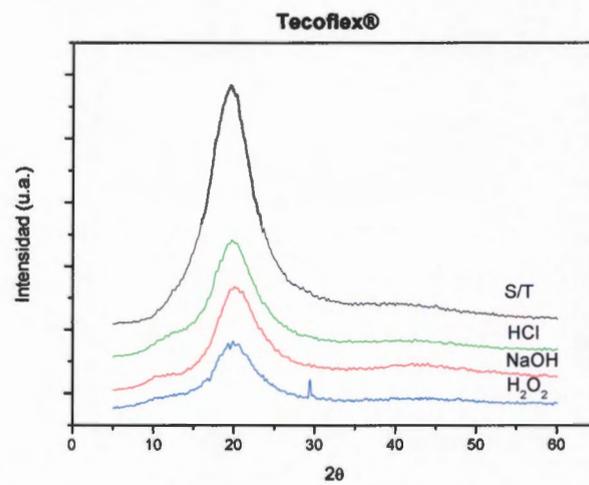
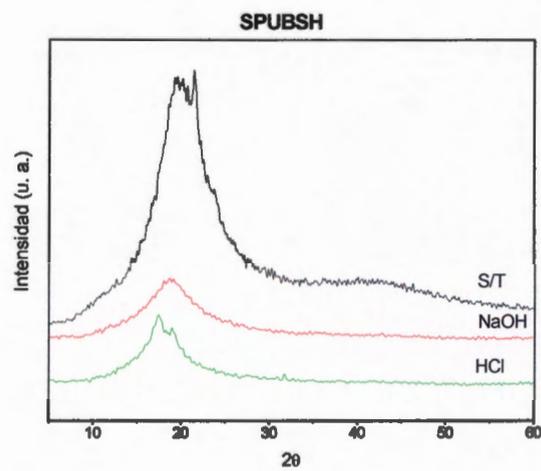
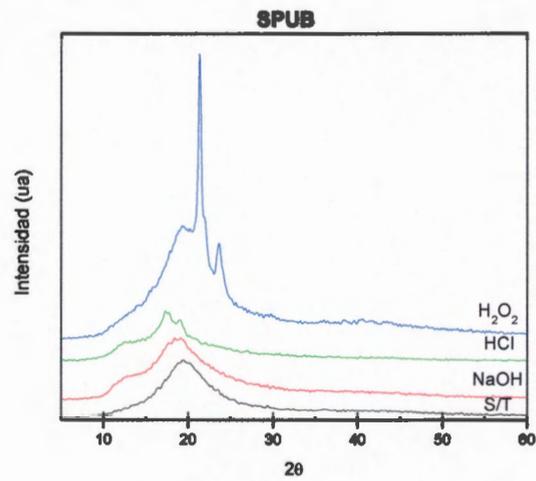


Figura 3.14. Difractogramas de poliuretanos segmentados sin degradar y degradados.

En cuanto a las muestras de SPUB degradadas por vía ácida y alcalina, estas no mostraron los picos correspondientes a la PCL cristalina, ya que la mayor parte de esta se degradó. Sin embargo, se observó un pequeño desplazamiento de los picos y la presencia de un pequeño pico a 17° y 13°, los cuales fueron más perceptibles en el caso de la degradación ácida. Esto puede deberse a un mejor empaquetamiento de los segmentos rígidos. En el caso de la degradación de SPUBSH se observó también un ligero desplazamiento de los picos y en caso de la degradación ácida se observó también la presencia del pico a 17°.

Para las muestras del Tecoflex[®] degradado no se esperaba la presencia de picos correspondientes a la cristalización del segmento flexible, y en su lugar se observó la inflexión característica del segmento rígido de los poliuretanos. En el caso de Tecoflex[®] degradado en medios ácidos o alcalinos se observó la presencia de un pico pequeño alrededor de 13°, esto por un reacomodo ocasionado por el tratamiento térmico y la disminución de los pesos moleculares ocasionados por la escisión de las cadenas.

3.3. Degradación oxidativa con catálisis

El estudio de la degradación oxidativa *in vitro* esta fisiológicamente justificado por estudios que revelan que estos medios imitan el medio ambiente creado en la interfase célula-material, y por lo tanto, puede emplearse para propósitos comparativos [43]. Se ha demostrado que 15 días de exposición *in vitro* en un medio de H₂O₂/CoCl₂ corresponden a 10 meses *in vivo*. Por esta razón, numerosos autores han utilizado este medio para evaluar la degradación oxidativa de los poliuretanos [42, 44, 48, 93].

3.3.1. Grado de hinchamiento y degradación oxidativa

La degradación hidrolítica de poliésteres alifáticos es un proceso muy complejo que involucra varios fenómenos de difusión y reacción, tales como adsorción de agua, rompimiento de enlaces éster, difusión y solubilización de las especies solubles [98]. Por lo tanto, en este estudio se evaluaron los cambios en la masa de las muestras degradadas sin eliminar el agua atrapada, ya que se espera que los materiales altamente hidrofílicos desplieguen alto contenido de agua al equilibrio. Los poliuretanos formados con PCL (SPUB y SPUBSH), mostraron cierto grado de hinchamiento como lo muestra la figura 3.15. El Tecoflex[®] por su parte mostró una mayor hidrofobicidad impidiendo la adsorción de agua y por lo tanto su hinchamiento como se observa en la figura 3.15.

La capacidad de hinchamiento de un polímero es un parámetro muy importante para aplicaciones biológicas. Si un material se hincha en exceso cuando entra en contacto con tejidos vivos, puede causar daño a los alrededores del tejido debido al incremento del volumen. Sin embargo, cierto grado de hidrofiliidad puede contribuir a una mejor biocompatibilidad [99]. Es bien conocido que la biocompatibilidad de los materiales poliméricos puede deberse en parte, a su habilidad para hincharse en medio acuoso. La porción de agua atrapada permite la difusión de metabolitos entre el tejido y el polímero y probablemente altere la morfología de la superficie polimérica, la cual esta en contacto con sangre o tejidos del organismo vivo [100].

La degradación oxidativa con catálisis mostró un mayor grado de hinchamiento en los polímeros con PCL. Esto puede deberse a que, la PCL

cristalina no puede hincharse en agua mientras que la PCL amorfa se hincha moderadamente [11].

Aunque los grupos éster son mas resistentes a la oxidación que los éter del Tecoflex[®] la mayor permeabilidad de los polímeros con PCL puede producir una mayor degradación y un aumento de la absorción de agua. Los poliuretanos SPUBSH mostraron un comportamiento similar durante su degradación en agua aunque la oxidación causó que su velocidad de hinchamiento fuera mayor y que al tercer día, la película se fragmentara y ya no fuera posible medir su grado de hinchamiento.

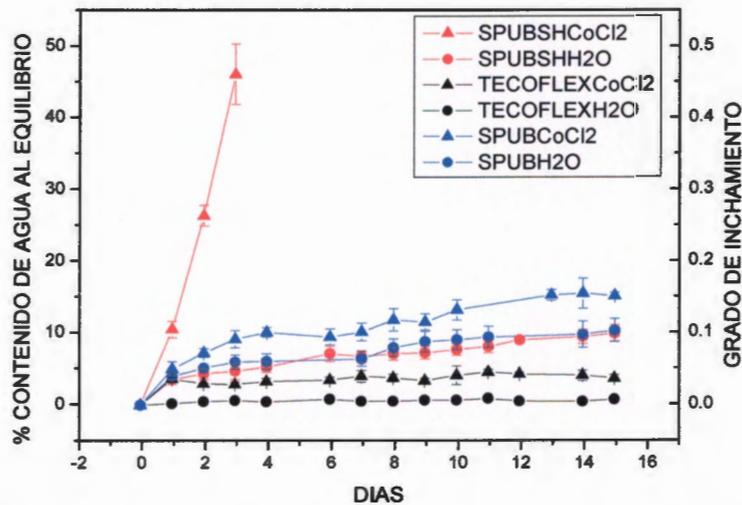


Figura 3.15. Efecto de la degradación oxidativa con catálisis.

Una degradación moderada es requerida para inducir el crecimiento de tejidos organizados. Si la degradación es muy rápida, el tejido puede no llegar a formarse resultando en la falla del material o dispositivo. Por otro lado, si la degradación es muy lenta, el dispositivo puede evitar la formación de un tejido mecánicamente resistente [101].

3.3.2. Caracterización mecánica de muestras degradadas por vía oxidativa con catálisis

La figura 3.16 y la tabla 3.2 muestran una disminución en el módulo elástico y la resistencia última, pero un aumento en la deformación máxima del SPUB cuando éste fue sometido a degradación oxidativa con catálisis. El esfuerzo máximo disminuyó un 88.5% lo que podría deberse en parte al efecto plastificante del agua, aunque también por formación de defectos debidas a la degradación. Ensayos de tensión de muestras secas nos podrían mostrar solamente el efecto de la degradación ocasionada por los agentes oxidantes; sin embargo dado que los poliuretanos tienen aplicación en un medio ambiente oxidante y acuoso al mismo tiempo, los resultados obtenidos nos dan una idea más real de los cambios que experimentará el material *in vivo*.

Los poliuretanos SPUBSH no pudieron analizarse por medio de las pruebas de tensión porque como ya se ha mencionó se desintegraron al tercer día. Sin embargo, si se pudo observar una pequeña disminución en su módulo elástico al ser expuesto al agua, pudiendo atribuirse al efecto plastificante del agua adsorbida aunque no se observó un aumento significativo en la elongación.

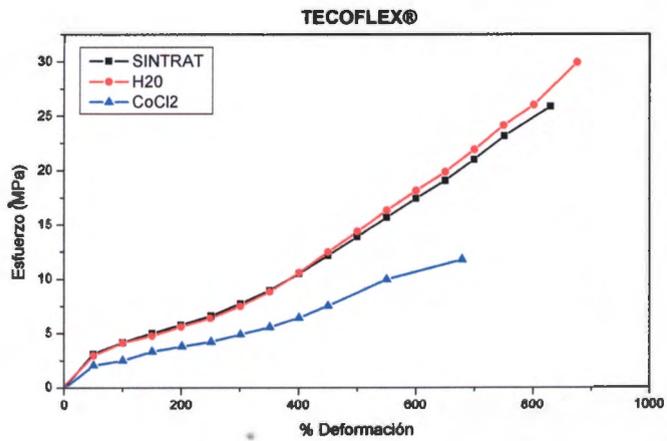
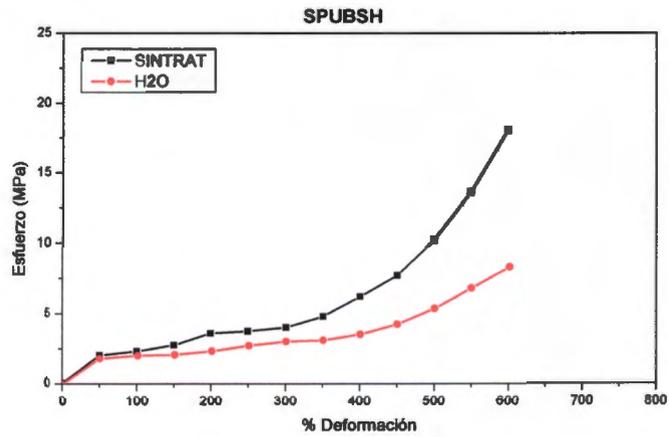
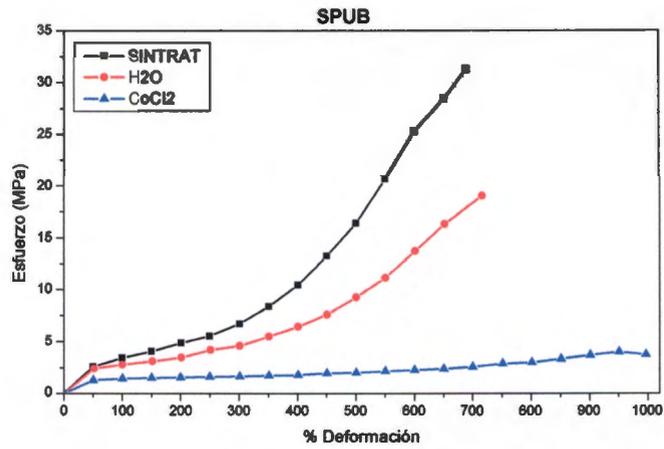


Figura 3.16. Efecto de la degradación oxidativa con catálisis sobre las propiedades mecánicas de los PU.

Por su parte, el módulo elástico y la deformación de Tecoflex[®] no fueron afectados significativamente cuando fueron sometidos a degradación en agua, esto debido a su pobre absorción de ésta. Sin embargo, se pudo observar una importante disminución en la resistencia máxima cuando fue expuesto a H₂O₂/CoCl₂, mostrando una importante degradación en este caso.

Tabla 3.2. Propiedades mecánicas de los SPUs sometidos a pruebas de degradación oxidativa.

Muestra	ϵ (%)	(σ) (MPa)	E ₁₀₀ (MPa)
SPUB	689.3±54.0	31.3±4.4	3.2±0.3
SPUBH ₂ O	715.2±49.4	19.0±2.7	2.8±0.02
SPUBCoCl ₂	996.4±270	3.7±1.4	1.3±0.2
SPUBSH	575.4±80	13.9±4.3	2.3±0.2
SPUBSHH ₂ O	613±21.1	9.0±1.6	1.8±0.2
SPUBSHCoCl ₂	-----	-----	-----
Tecoflex [®]	830±106	25.8±4.6	4.3±0.2
Tecoflex [®] H ₂ O	874.9±100	29.9±4.5	4.1±0.3
Tecoflex [®] CoCl ₂	679±160	11.7±3.9	2.5±0.2

ϵ = Deformación máxima; σ =Esfuerzo máximo; E₁₀₀=Módulo al 100% de deformación.

3.4. Modificación superficial con L-Cisteina

La modificación superficial que se realizó a SPUB, nos permitió comparar dos superficies con grupos tioles colgantes incorporados de manera diferente. En este caso, la modificación superficial nos permitió obtener grupos tioles superficiales (mediante el injerto de L-cisteina), sin afectar las

propiedades en la masa del polímero. En el caso de SPUBSH, los grupos tioles fueron introducidos durante la síntesis mediante el extendedor de cadena quedando los grupos tioles no sólo en la superficie sino también en la masa del polímero.

3.4.1. Hidroxilación

Una de las causas de la formación de trombos es la falta de endotelio, el cual normalmente sintetiza numerosos inhibidores de la trombosis. Por lo tanto, la modificación superficial, con el fin de producir superficies biomiméticas más compatibles, ha sido muy importante [83]. La funcionalización de una superficie, por ejemplo la hidroxilación, como paso previo al injerto de una molécula importante, ha sido una técnica empleada por numerosos autores. Ésta se ha intentado por medio de diferentes técnicas ya que los grupos OH son muy reactivos y por medio de ellos se pueden injertar muchas moléculas [102].

En este estudio la hidroxilación de SPUB se llevó a cabo por hidrólisis alcalina, aprovechando los grupos éster de la PCL que son fácilmente hidrolizables en medios alcalinos (ver figura 3.17) [77]. La literatura ha mostrado que la hidrólisis en medios alcalinos es más eficiente para la funcionalización de superficies poliméricas con grupos éster en comparación con el tratamiento en medios ácidos. La mojabilidad es incrementada sin pérdida de masa durante los tratamientos en medios alcalinos, mientras que en medios ácidos se produce un efecto más corrosivo sin aumentar la funcionalización de la superficie [86]. Esto último concuerda con el efecto observado durante la degradación en HCl de las películas de SPUB y SPUBSH como se mostró en las graficas 3.11 y 3.12.



Figura 3.17.- Representación esquemática de la hidroxilación de grupos éster por hidrólisis alcalina.

La hidroxilación fue verificada mediante la determinación de ángulos de contacto en las muestras sin hidroxilar e hidroxiladas. En la figura 3.18 se puede apreciar una disminución en el ángulo de contacto de las muestras hidroxiladas, indicando que la hidroxilación con NaOH 1M por 1 hora a 40°C resultó eficiente para introducir grupos hidroxilos en la superficie sin causar pérdida de masa considerable en las muestras.

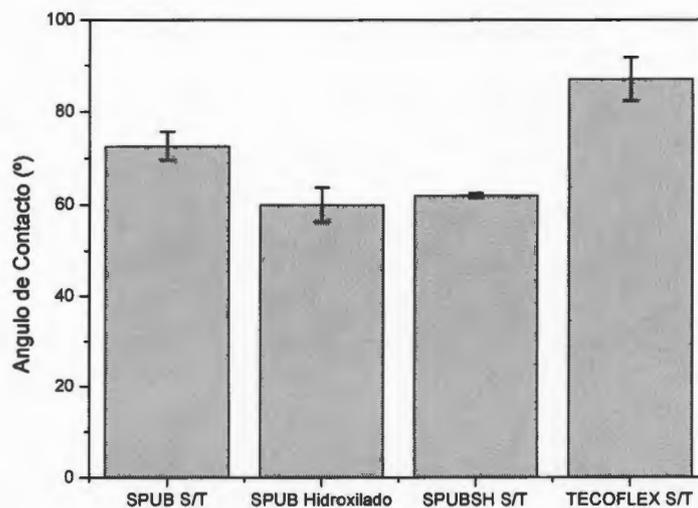


Figura 3.18. Ángulos de contacto de los poliuretanos

3.4.2. Injerto de Glutaraldehído

Los grupos hidroxilo pueden reaccionar fácilmente con grupos aldehído, por esta razón el glutaraldehído fue utilizado como puente entre los hidroxilos superficiales formados durante la hidrólisis alcalina del SPUB y la L-cisteína, portadora de los grupos SH de nuestro interés.

Tomando en cuenta que cada molécula de glutaraldehído es capaz de reaccionar con dos grupos hidroxilos, es importante contar con sólo una pequeña cantidad de hidroxilos, pues el espaciamiento entre los grupos -OH permite conservar grupos aldehído que puedan reaccionar con la L-cisteína [103].

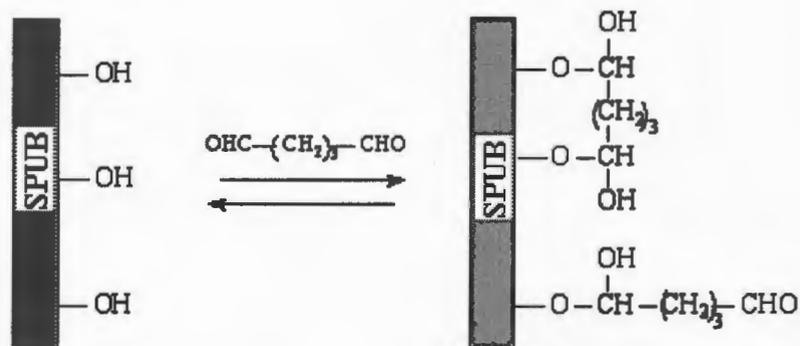


Figura 3.19. Injerto de glutaraldehído a través de grupos hidroxilo.

3.4.3. Injerto de L-cisteína

El injerto de la L-cisteína no pudo ser detectado por microanálisis, sin embargo, si pudo ser detectado por medio del reactivo de Ellman, donde se observó una concentración de grupos tioles de $0.131 \mu\text{mol/g}$ de muestra ($0.999 \pm 0.55 \text{ nmol/cm}^2$, o sea aprox. $60 \text{ tioles}/\text{\AA}^2$), una cantidad mucho menor que la encontrada en SPUBSH ($1.0628 \mu\text{mol/g}$). Este contenido fue

igualmente menor que la alcanzada por Duan *et al* [4] quienes injertaron L-cisteína en Tecoflex por medio de la funcionalización con un silano e injerto a través de los grupos amino, logrando una concentración de grupos tioles de 5.2 ± 0.9 nmol/cm². Del mismo modo, Alferiev *et al.* [6] inmovilizaron grupos tioles en la superficie de poliuretanos por medio de grupos tioles acetilados logrando concentraciones menores de 0.1 nmol/cm², es decir, 1 tiol por cada 150 Å² en la superficie. Esta área es mucho mas pequeña que la requerida para acomodar una proteína típica conteniendo cientos de aminoácidos. Por lo tanto un aumento en la cantidad de grupos tioles podría no ser práctico en muchos casos [4].

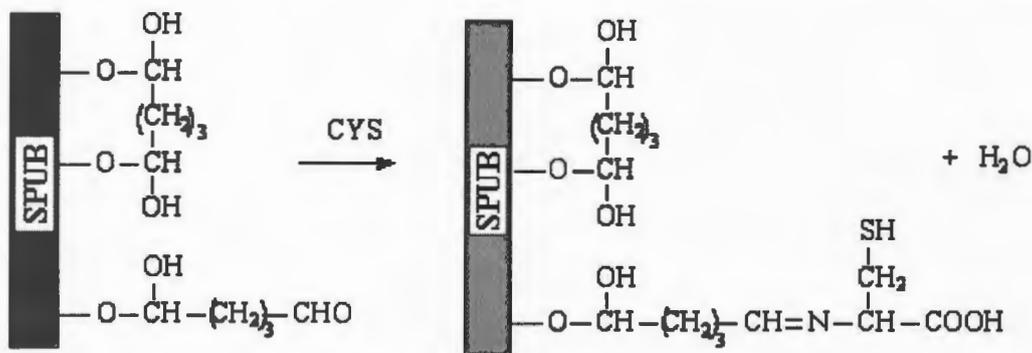


Figura 3.20. Injerto de L-cisteína a través de un puente de glutaraldehído.

3.5. Ensayos de hemocompatibilidad

Los ensayos de hemocompatibilidad son muy importantes en el estudio de materiales para uso médico y por ello muchos de los estudios sobre la síntesis o modificación de materiales están enfocados en la mejora de la biocompatibilidad de los materiales.

3.5.1. Determinación del tiempo de coagulación con sangre completa

Las posibles interacciones cuando la superficie de un implante es expuesta a la sangre son numerosas ya que se perturba el proceso normal de

coagulación. Tomando en cuenta esto, se analizaron los tiempos de coagulación con sangre completa. La adsorción de proteínas del plasma es uno de los primeros eventos que ocurre, seguido por la adhesión de células afectando la composición sanguínea y sus funciones. Estas interacciones implican procesos variados tales como simple indiferencia hacia la superficie, tensión de las membranas celulares acompañada por la alteración de las funciones moleculares y celulares, y finalmente, la destrucción celular en la sangre o en la superficie.

Un tiempo de coagulación muy prolongado de la sangre sobre las superficies tratadas puede ser correlacionado con las mediciones de tiempo de evolución del coágulo. Generalmente se considera que la adsorción de albúmina en altas cantidades podría inactivar la interfase sangre-material, mientras que el fibrinógeno adsorbido en altas cantidades podría favorecer la adherencia plaquetaria y la activación del sistema de coagulación [104].

El proceso de coagulación es un proceso muy complejo en el que intervienen una gran cantidad de elementos, por lo que los tiempos de coagulación con sangre completa nos dan una idea general del efecto de la superficie del material en el proceso de coagulación. Muchos investigadores han usado sangre completa, incluso la norma ISO-10993-4, establece el uso de este método entre las pruebas para hemocompatibilidad [82, 87, 104-106].

La figura 3.21 muestra a los tiempos de coagulación inicial, es decir cuando la sangre muestra los primeros coágulos. El tiempo de coagulación de la sangre completa de una persona sana sobre una superficie de vidrio se considera normal en un intervalo de 4 a 10 min. Para este estudio el tiempo de coagulación de la sangre en vidrio estuvo en el intervalo de 4.33-5.48 minutos siendo estos tiempos cortos pues se considera al vidrio una superficie

altamente trombogénica. Por su parte, el Tecoflex[®] mostró un tiempo de coagulación mayor, ya que se encontró por arriba de los 8 minutos.

El poliuretano que mostró el mayor tiempo de coagulación fue SPUB sin tratamiento. En este estudio también se observó que la modificación superficial del SPUB condujo a la disminución del tiempo de coagulación, posiblemente por el tratamiento químico previo al injerto de L-cisteína, especialmente la hidroxilación. Análisis de tiempos de coagulación realizadas a superficies hidroxiladas mostraron una disminución considerable en el tiempo de coagulación, el cual aumentó nuevamente al modificar con L-cisteína, aunque no alcanzó los tiempos de coagulación de SPUB sin tratamiento, como se observa en la gráfica 3.21.

Por su parte, el SPUBSH, contrario a lo que se esperaba, tuvo un efecto ligeramente más trombogénico que el Tecoflex[®] y que el SPUB, mostrando que el DTE tiene un efecto negativo en la hemocompatibilidad. Es probable que el almacenamiento de SPUBSH ocasionara una disminución de los grupos tioles en estado reducido como mostró la prueba de Ellman realizada antes de las pruebas de hemocompatibilidad. Sin embargo, tomando en cuenta la presencia de grupos OH sin reaccionar en SPUBSH, este se modificó con glutaraldehído y L-cisteína. Este tratamiento adicional, presentaba la posibilidad de restablecer los grupos SH ya que la L-cisteína puede actuar como agente reductor. El resultado de esta modificación fue un aumento en los tiempos de coagulación como se observa en la figura 3.21.

Una explicación probable al hecho de que el SPUB presentara un tiempo de coagulación mayor comparado con el Tecoflex[®] se encuentra en sus diferencias en hidrofobicidad y permeabilidad al agua. Esto es, se ha reconocido que el agua juega un papel importante en la determinación de la

3.5.4.2. Morfología en presencia de plasma (Después del análisis TTPa)

Cuando las películas de los poliuretanos fueron expuestas a plasma sanguíneo con reactivo de TTPa (figura 3.25) se observó una nula adsorción de fibrina en el SPUBSH-cis y el Tecoflex, lo que indica que estas superficies desencadenaron la vía intrínseca. Por otro lado, el SPUB y el SPUB-cis, mostraron adsorción de proteína en su superficie aunque no se observó claramente la presencia de fibras, lo que puede indicar adhesión de fibrinógeno o etapas iniciales de conversión de fibrinógeno en fibrina. En el SPUBSH se observó la formación de algunas fibras de fibrina, en etapas más avanzadas del proceso de coagulación. La presencia de L-cisteína en las superficies condujo a una importante disminución en la adsorción de proteína lo que concuerda con los resultados encontrados en las pruebas de TTPa.

3.5.4.3. Morfología en presencia de plasma (Después del análisis TP)

De las superficies expuestas a plasma con reactivo de TP, sólo el Tecoflex mostró la presencia de fibrina en su superficie, como se observa en la micrografías de la figura 3.26, lo que nos indica que el proceso de coagulación en el Tecoflex es inducido principalmente a través de la vía extrínseca.

- Bis(4-phenyl isocyanate). *Journal of Applied Polymer Science* 88, 380, 2003.
- 23.Y. Ozdemir; N. Hasirci. Oxygen plasma modification of polyurethane membranes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 13, 1147, 2002.
- 24.M-S Yen; P-Y Tsai. Effects on the Structure and properties of Membranes Formed by Blending Polydimethylsiloxane Polyurethane into Different Soft-Segmented Waterborne Polyurethanes. *Journal of Applied polymer Science*, 102, 210, 2006.
- 25.B. D. Ratner; A. S. Hoffman; F. J. Schoen; J. E. Lemons. *Biomaterials Science, An Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press, USA, 1996. pp. 50, 193-199.
- 26.J. E. Puskas; Y. Chen. Biomedical Application of Commercial Polymers and Novel Polyisobutylene-Based Thermoplastic Elastomers for Soft Tissue Replacement. *Biomacromolecules* 5, 1141, 2004.
- 27.J.P. Santerre; K. Woodhouse; G. Laroche; R.S. Labow. Understanding the biodegradation of polyurethanes: From classical implants to tissue engineering materials. *Biomaterials*, 26, 7457, 2005.
28. Y. W. Tang; R. S. Labow; I Revenko; J. P. Santerre. Influence of surface morphology and chemistry on the enzyme catalyzed biodegradation of polycarbonate-urethanes. *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition*. 13, 463, 2002.
- 29.S. H. Hsu; Y. Ch. Kao. Biocompatibility of poly(carbonate urethane)s with various degrees of nanophase separation. *Macromolecular Bioscience*. 5, 246, 2005.

- 30.S. L. Huang; J.Y. Lai. Gas permeability of crosslinked HTPB-H₁₂MDI based polyurethanes membrane. *Journal of Applied Polymer Science* 58, 1913, 1995.
- 31.K. Ulubayram; N. Hasirci. Polyurethanes: effect of chemical composition on mechanical properties and oxygen permeability. *Polymer*, 33, 2084, 1992.
- 32.M. Jiang; P. Hu. Surface modification of a biomedical poly(ester) urethane by several low-powered gas plasma. *Journal of Applied Polymer and Science*. 101, 1273, 2006.
- 33.A. Kanapitsas; P. Pssis, J. L. Gomez-Ribelles; M. Monleon-Pradas; E. G. Privalko; V. P. Privalko. Molecular mobility and hydration properties of segmented polyurethanes with varying structure of soft- and hard-chain segments. *Journal Applied Polymer Science* 71, 1209, 1999.
- 34.H. Yeganeh; S. Jamshidi; P. H. Talemi. Synthesis, characterization and properties of novel thermally stable poly(urethane-oxazolidone) elastomers. *European Polymer Journal* 42, 1743, 2006.
- 35.M. F. Sonnenschein; Z. Lysenko; D. A. Brune; B. L. Wendt; A. K. Schrock. Enhancing polyurethane properties via soft segment crystallization. *Polymer* 46, 10158, 2005.
- 36.K. kojio; T. Fukumaru; M. furukawa. Highly softened polyurethane elastomer synthetized with novel 1,2-bis(isocyanate)ethoxyetane. *Macromolecules*, 37, 3287, 2004.
- 37.M.-S. Yen; H.-C. Tsai; P.-D. Hong. Effect of soft segment composition on the physical properties of nonionic aqueous polyurethane containing

- side chain PEGME. *Journal of Applied Polymer Science* 105, 1391, 2007.
- 38.S. Velankar; S. L. Cooper. Microphase separation and rheological properties of polyurethane melts. 1. Effect of block length. *Macromolecules*, 31, 9181, 1988.
- 39.M. S. Sánchez-Adsuar; E. Pavón; J-J. Villenave. Influence of the synthesis conditions on the properties of thermoplastics polyurethane elastomers. *Journal Polymer Science* 76, 1590, 2000.
- 40.Z. Liu; X. Wu; X. Yang; D. Liu; C. Jun; R. Sun; X. Liu; F. Li. Synthesis and characterization of novel blood-compatible soluble chemically cross-linked polyurethanes with excellent mechanical performance for biomedical applications. *Biomacromolecules*, 6, 1713, 2005.
- 41.A. M. Heintz; D. J. Duffy; Sh. L. Hsu. Effects of reaction temperature on the formation of polyurethane prepolymer structures. *Macromolecules* 36, 2695, 2003.
- 42.M. J. Wiggins; J. M. Anderson; A. Hiltner. Effect of strain rate on fatigue-accelerated biodegradation of polyurethane. *Journal Biomedical Materials Research*. 66A, 463, 2003.
- 43.J. E. McBane; J. P. Santerre; R. S. Labow. The interaction between hydrolytic and oxidative pathways in macrophage-mediated polyurethane degradation. *Journal Biomedical Materials Research*. 82A, 984, 2007.
- 44.E. M. Christenson; J. M. Anderson; A. Hiltner. Antioxidant inhibition of poly(carbonate urethane) in vivo biodegradation. *Journal Biomedical Materials Research*. 76A, 480, 2006.

- 45.V. Thomas; T. V. Kumari; M. Jayabalan. In vitro studies on the effect of physical cross-linking on the biological performance of aliphatic poly(urethane urea) for blood contact applications. *Biomacromolecules*, 2, 588, 2001.
- 46.R. Y. Kannan; H. J. Salacinski; M. Odlyha; P. E. Butler; A. M. The degradative resistance of polyhedral oligomeric silsesquioxane nanocored integrated polyurethanes: An in vitro study. *Biomaterials* 27, 1971, 2006.
- 47.T. Nakajima-Kambe; Y. Shigeno-Akutsu; N. Nomura; F. Onuma; T. Nakahara. Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. *Applied microbiological Biotechnology*. 51, 134, 1999.
- 48.S. J. Stachelek; I. alferiev; H. Choi; Ch. W. Chan; B. Zubiante; M. Sacks; R. Composto; I. Chen; R. J. Levy. Prevention of oxidative degradation of polyurethane by covalent attachment of di-tert-butylphenol residues. *Journal Biomedical Material Research*. 78A, 651, 2006.
- 49.G. M. Bernacca; T. G. Mackay; R. Wilkinson; D. J. Wheatley. Polyurethane heart valves: Fatigue failure calcification and polyurethane structure. *Journal Biomedical Materials Research*. 34, 371, 1997.
- 50.R. L. Lanza; R. Langer; J. Vacanti. Principles of tissue engineering. Edit. Academic Press. USA, 2000, p 263, 264, 425-441.
- 51.A. J. Domb; N. Kumar; T. Sheskin; A. Bentolila; j. Slager; D. Teomim. Biodegradable polymers as drug carrier systems. *Polymeric Biomaterials*. D. Severian Edit. Marcel Dekker. USA, 2002, pp 96, 97.

52. G. A. Skarja; K. A. Woodhouse. Structure-property relationships of degradable polyurethane elastomers containing an amino acid-based chain extender. *Journal of Applied Polymer Science* 75, 1522, 2000.
53. Y. Wang; M. A. Rodríguez-Pérez; R. L. Reis; J. F. Mano. Thermal and thermomechanical behaviour of polycaprolactone and starch/polycaprolactone blends for biomedical applications. *Macromolecular Materials Engineering*. 290, 792, 2005.
54. K. C. Ang; K. F. Leong; C. K. Chua; M. Chandrasekaran. Compressive properties and degradability of poly(ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite composites under accelerated hydrolytic degradation. *Journal Biomedical Materials Research* 80A, 655, 2007.
55. M. Furukawa; T. Shiiba; S. Murata. Mechanical properties and hydrolytic stability of polyesterurethane elastomers with alkyl side groups. *Polymer*, 40, 1791, 1999.
56. W. Wang; P. Ping; H. Yu; X. Chen; X. Jing. Synthesis and characterization of a novel biodegradable, thermoplastic polyurethane elastomer. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. 44, 5505, 2006.
57. B. Bogdanov; V. Toncheva; E. Schacht; L. Finelli; B. Sarti; M. Scandola. Physical properties of poly(ester-urethanes) prepared from different molar mass polycaprolactone-diols. *Polymer*, 40, 3171, 1999.
58. C. Eldsäter; B. Erlandsson; R. Renstad; A.-C. Albertsson; S. Karlsson. The biodegradation of amorphous and crystalline regions in film-blown poly(ϵ -caprolactone). *Polymer*, 41, 1297, 2000.

- 59.M. Sun. Assessment of solvent cast poly(ϵ -caprolactone) films as a biomaterial nerve repair. 21st European Conference on Biomaterials, Brighton, UK, 2007.
- 60.J. E. Báez; A. Marcos-Fernández; R. Lebrón-Aguilar; A. Martínez-Richa. A novel route to α,ω -telechelic poly(3-caprolactone) diols, precursors of biodegradable polyurethanes, using catalysis with decamolybdate anion. *Polymer*, 47, 8420, 2006.
- 61.C. J. Spaans; J. H. De Groot; V. W. Belgraver; A. J. Pennings. A new biomedical polyurethane with a high modulus based on 1,4-butanediisocyanate and ϵ -Caprolactone. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 9, 675, 1998.
- 62.M. K. Hassan; K. A. Mauritz; R. F. Storey; J. S. Wiggins. Biodegradable aliphatic thermoplastic polyurethane based on poly(ϵ -caprolactone) and L-Lysine diisocyanate. *Journal Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 44, 2990, 2006.
- 63.B. Asplund; T. Bowden; T. Mathisen; J. Hilborn. Synthesis of highly elastic biodegradable poly(urethane urea). *Biomacromolecules*, 8, 905, 2007.
- 64.J. H. de Groot; R. de Vrijer; B. S. wildeboer; C. S. Spaans; A. J. Pennings. New biomedical polyurethane ureas with high tear strengths. *Polymer Bulletin* 38, 219, 1997.
- 65.D. Motlagh; J. Allen; R. Hoshi; J. Yang; K. Lui, G. Ameer. *Journal Biomedical Materials Research*. 82A, 907, 2007.
- 66.W. Meng ; J.-Y. Hyun; D.-I. Song; I.-K. Kang. Surface modification and in vitro blood compatibilities of polyurethanes containing z-lysine segments. *Journal of Applied Polymer Science*. 90, 1959, 2003.

- 67.R. E. Solís-Correa. Síntesis de poli(éter uretanos) segmentados para aplicaciones cardiovasculares. Tesis de Doctorado. CICY. Yucatán, México, 2007.
- 68.J. Black; Biological performance of materials. Fundamentals of biocompatibility. Marcel Dekker, USA, Second edition, 1999, p 148-152.
- 69.M. Jirošková; J. Bartuňkova; K. Smetana Jr; J. Lukáš; J. Vasík; J. E. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 8, 19, 1997.
- 70.F. Ayhan; A. Y. Rad; H. Ayhan. Biocompatibility investigation and urea removal from blood by urease-immobilized HEMA incorporated poly(ethyleneglycol dimethacrylate) microbeads. Journal Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 64B, 13, 2003
- 71.Y-X Wang, J. L. Robertson, W. B. Spillman Jr., R. O. Claus. Effects of the Chemical Structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility. Pharmaceutical Research, 21, 1362, 2004.
- 72.J. H. Kim; S. C. Kim. PEO-grafting on PU/PS IPNs for enhanced blood compatibility-effect of pendant length and grafting density. Biomaterials 23, 2015, 2002.
- 73.Y. H. Kim; D. K. Han; K. D. Park; S. H. Kim. Enhanced blood compatibility of polymers grafted by sulfonated PEO via a negative cilia concept. Biomaterials 24, 2213, 2003.
- 74.P. Roach; D. Eglin; K. Rohde; C. C. Perry. Modern biomaterials: a review—bulk properties and implications of surface modifications. Journal Materials Science: Materials in Medicine 18, 1263, 2007.

- 75.R. L. Reis; J. San Román. Biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine. CRC Press, USA, 2005, p 430.
- 76.C. Sperling; R. Schweiss; C. Werner. Initiation of blood coagulation-evaluation the relevance of specific surface functionalities using self assembled monolayers. 21st European Conference on Biomaterials, Brighton, UK, 2007.
- 77.H. Sun; S. Öneby. Facile polyester surface functionalization via hydrolysis and cell-recognizing peptide attachment. *Polymer International* 55, 1336, 2006.
- 78.J.-P. Müller; E. Mitzner; H. Goering; J. Gähde. Surface modification of polyurethanes by multicomponent polyaddition reaction. *Journal of Materials Science Letters*. 17, 115, 1998.
- 79.N. Morimoto; Y. Iwasaki; N. Nakabayashi; K. Ishihara. Physical properties and blood compatibility of surface-modified segmented polyurethane by semi-interpenetrating polymer networks with a phospholipid polymer. *Biomaterials* 23, 4881, 2002.
- 80.J. Zhang; J. Yuan; Y. Yuan; X. Zang; J. Shen; S. Lin. Platelet adhesive resistance of segmented polyurethane film surface-grafted with vinyl benzyl sulfo monomer of ammonium zwitterions. *Biomaterials* 24, 4223, 2003.
- 81.C. Freij-Larsson; P. Jannaasch; B. Wesslén. Polyurethane Surfaces Modified by Amphiphilic Polymers: Effects on Protein Adsorption. *Biomaterials* 21, 307, 2000.
- 82.J. H. Park; K. D. Park; Y. H. Bae. PDMS-based polyurethanes with MPEG grafts: synthesis, characterization and platelet adhesion study. *Biomaterials* 20 (1999) 943-953.

- 83.A. G. Kidane; H. J. Salacinski; G. punshon; B. Ramesh; K. S. Srai; A. M. Seifalian. *Medical Biology Engineering Computational* 41, 740, 2003.
- 84.H. Gappa-Fahlenkamp; R. S. Lewis. Improved hemocompatibility of poly(ethylene terephthalate) modified with various thiol-containing groups. *Biomaterials* 26, 3479, 2005.
- 85.H-W. Jun; L. J. Taite; J. L. West. Nitric Oxide-Producing polyurethanes. *Biomacromolecules*, 6, 838, 2005.
- 86.W. Chen; T. J. McCarthy. Chemical Surface Modification of Poly(ethylene terephthalate). *Macromolecules*. 31, 3648, 1998.
- 87.B. Mendoza-Novelo. Efecto de Surfactantes, Agentes de Entrecruzamiento y Cisteína sobre las Propiedades Físicas y Químicas de pericardio de Bovino con Aplicaciones Cardiovasculares. Tesis de Maestría. CICY, Mexico, 2006.
- 88.A.F.S.A. Habbeb. Reaction of proteil sulfhydryl groups with Ellman's reagent. *Methods in Enzimology* 25(1978)457-64.
- 89.Y. Iwasaki; N. Shibata; M. Ninomiya; K. Kurita; N. Nabayashi; K. Ishihara. Importance biofouling-resistant phospholipids polymer to create a heparinized blood-compatible surface. *Journal Biomaterial Science Polymer Edition*, 13, 323, 2002.
- 90.R. E. Solís-Correa; R. Vargas-Coronado; M. Aguilar-Vega; J. V. Cauich-Rodríguez; J. San Román; A. Marcos. Synthesis of HMDI-based segmented polyurethanes and their use in the manufacture of elastomeric composites for cardiovascular applications. *Journal of Biomaterial Science: Polymer Edition*. 18, 561, 2007.
- 91.P. Prabu; N. Dharmaraj; S. Aryal; B. M. Lee; V. Ramesh; H. Y. Kim. Preparation and drug release activity of scaffolds containing collagen

- and poly(caprolactone). *Journal Biomedical Materials Research* 79A, 153, 2006.
- 92.S.H. Wang; L. F. Silva; J. Kloss; M. Munaro; G. Pinto de Souza; M. A. Wada; J. G. C. Gómez; S. Zawadzki; L. Akcelrud. Polycaprolactone based biodegradable polyurethanes. *Macromolecular Symposium*. 197, 255, 2003.
- 93.D. J. Martin; L. A. Poole-Warren; P. A. Gunatillake; S. J. McCarthy; G. F. Meijs, Klaus Schindhelm. New methods for the assessment of in vitro stress cracking in biomedical polyurethanes. *Biomaterials*, 22, 973, 2001.
- 94.L. Fambri; C. Migliaresi; K. Kesenci; E. Piskin. Biodegradable polymers, en: *Integrated biomaterials science*, editado por: R. Barbucci (Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2002) p 119-187.
- 95.Y. D. Kim, S. C. Kim. Effect of chemical structure on the biodegradation of polyurethanes under composting conditions. *Polymer degradation and stability*. 62, 343, 1998.
- 96.S. J. McCarthy; G. F. Meijs; N. Mitchell; P. A. Gunatillake; G. Heath; A. Brandwood; K. Schindhelm. In-vivo degradation of polyurethanes: transmission-FTIR microscopic characterization of polyurethanes sectioned by cryomicrotomy. *Biomaterials*, 18, 1387, 1997.
- 97.Y. Wu; C. Sellitti; J. M. Anderson; A. Hiltner; C. A. Lodoen; C. R. Payet. An FTIR-ATR Investigation of *In Vivo* Poly(ether urethane) Degradation. *Journal of Applied Polymer Science*, 46, 201, 1992.
- 98.M.-H. Huang; S. Li; M. Vert. Synthesis and degradation of PLA-PCL-PLA triblock copolymer prepared by successive polymerization of ϵ -caprolactone and D-L-lactide. *Polymer*, 45, 8675, 2004.

99. P. Ferreira; A. F. M. Silva; M. I. Pinto; M. H. Gil. Development of a biodegradable bioadhesive containing urethane groups. *Journal of materials science. Materials in medicine.* 19, 111, 2008.
100. G. A. Abraham; A. A. A. de Queiroz; J. San Román. Immobilization of a nonsteroidal antiinflammatory drug onto commercial segmented polyurethane surface to improve haemocompatibility properties. *Biomaterials* 23, 1625, 2002.
101. K. Gisselält; B. Edberg; P. Flodin. Synthesis and properties of degradable poly(urethane urea)s to be used for ligament reconstructions. *Biomacromolecules*, 3, 951, 2002.
102. C. H. Bamford; G. Al-Lamee. Studies in polymer surface functionalization and grafting for biomedical and other applications. *Polymer* 35, 2844, 1994.
103. Y. Zhang, M. Jiang, J. Zhao, J. Zhou, D. Chen. Hollow Spheres from Shell cross-linked, noncovalently connected micelles of Carboxyl-terminated polybutadiene and poly(vinyl alcohol) in water. *Macromolecules* 37, 1537, 2004.
104. I. Topala; N. Dumitrascu; V. Pohoata. Influence of Plasma Treatments on the Hemocompatibility of PET and PET + TiO₂ Films. *Plasma Chemical Plasma Process* 27, 95, 2007.
105. J. M. Buchanan; P. J. Upman; R. F. Wallin. A Practical Guide to ISO 10993-4: Hemocompatibility. *Medical Device & Diagnostic Industry Magazine MDDI Article Index.* An MD&DI November 1998 Column.

106. N. Hasirci; E. A. Aksoy. Synthesis and modifications of polyurethanes for biomedical purposes. *High Performance Polymers*, 19, 621, 2007.
107. J. Lahann; D. Klee; H. Thelen; H. Bienert; D. Vorwerk; H. Höcker. Improvement of haemocompatibility of metallic stents by polymer coating. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 10, 443, 1999
108. E. Cenni; C. Fotia; M. Salerno; D. Granchi; S. Avnet; F. Castelli; D. Micieli; M.G. Sarpietro; R. Pignatello; A. Giunti; N. Baldini. Blood compatibility and cytocompatibility of osteotropic nanoparticles for drug delivery in bone diseases. 21st European Conference on Biomaterials, Brighton, UK. 2007.
109. M. Wan; D. K. Baek; J-H. Cho; I-K. Kang. In vitro compatibility of heparin-immobilized polyurethane containing ester groups in the side chain. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 15, 1079, 2004.
110. A. Díaz-Concepción; D. Almagro-Vázquez; A. Brito-Martínez. Sensibilidad del tiempo parcial de tromboplastina activado a la eficiencia de factores VIII Y IX y a la heparina. *Revista Cubana de Hematología Inmunología Hemoterapia* 17, 41, 2001.
111. O. Pantaleón-Bernal. Anticoagulación oral. *Revista Cubana de Angiología y Circulación Vascular* 2, 149, 2001.

APÉNDICE I.

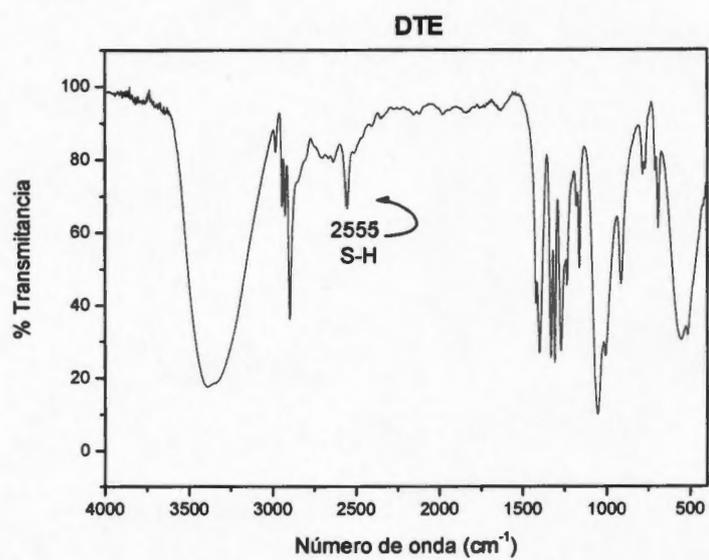


Figura Ia . Espectro de infrarrojo de DTE

APÉNDICE II.

PU-BDO fue sintetizado por medio de un solo paso en donde se hizo reaccionar HMDI y BDO.

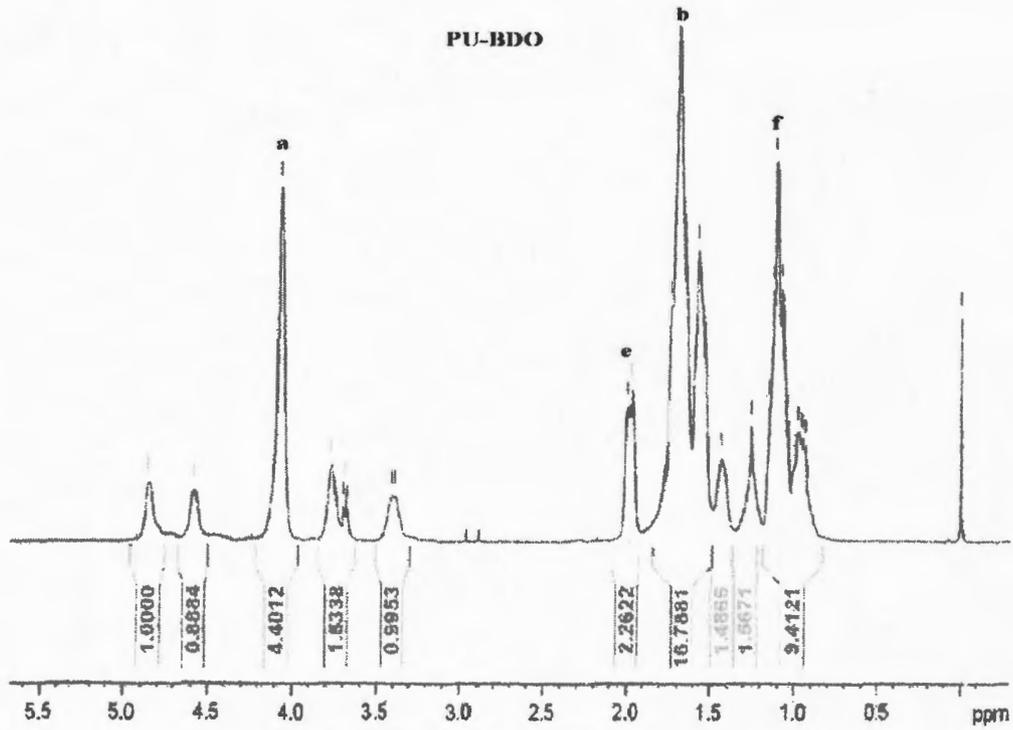


Figura IIa. H¹RMN de PU de un paso

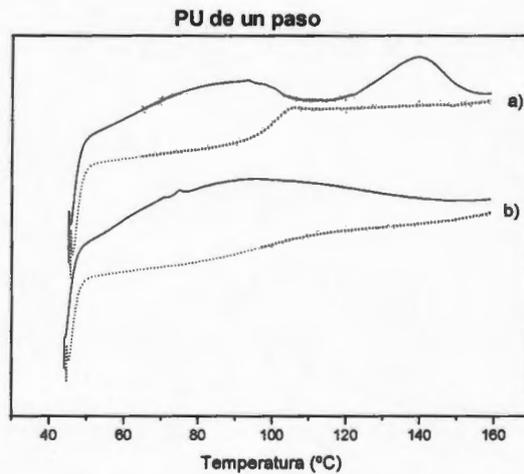


Figura IIb. Termogramas de DSC para PU de un paso. a) PU con BDO y b) PU con DTE. En primera (línea continua) y segunda corrida (línea punteada).

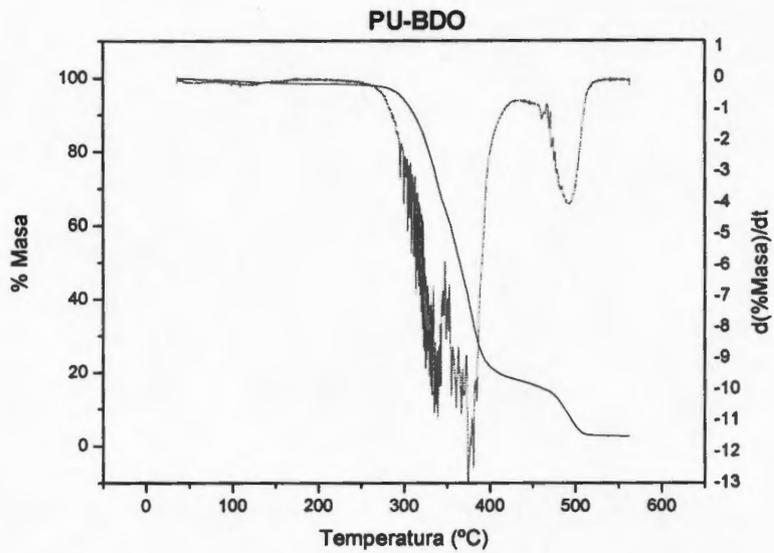


Figura IIIc. Análisis termogravimétrico de PU-BDO

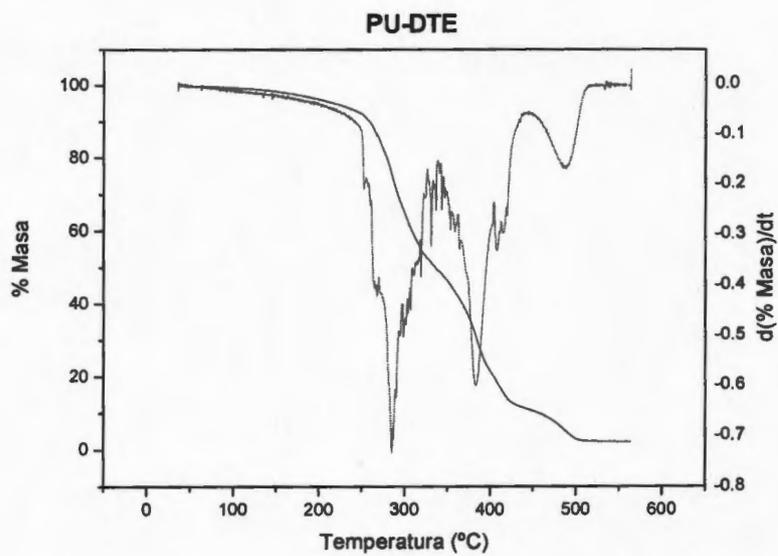


Figura III d. Análisis termogravimétrico de PU-DTE