



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C

Posgrado en Materiales Poliméricos

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE
POLIURETANOS SEGMENTADOS
BIODEGRADABLES PARA REGENERACIÓN ÓSEA**

Tesis que presenta

M.C. SAIDY MARGELY CETINA DÍAZ

En opción a título de

**DOCTOR EN CIENCIAS DE MATERIALES
POLIMÉRICOS**

Director de tesis

Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez

Mérida Yucatán a 24 de enero 2014.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Saidy Margely Cetina Díaz titulado **Síntesis Y Caracterización De Poliuretanos Segmentados Biodegradables Para Regeneración Ósea**, fue realizado en la Unidad de Materiales, en la línea de investigación de Materiales Para Medicina Regenerativa en el Laboratorio de Química Macromolecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez

Atentamente.

Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 13 de Noviembre de 2017

DEDICATORIAS

Agradezco a Dios quien supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante ante los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder la dignidad ni desfallecer en el intento.

Con mi cariño y amor para las personas que hicieron todo en la vida para que pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y agradecimiento Margeli y Humberto mis padres.

A mis hermanos y cuñados (a) que son importantes en mi vida, que siempre estuvieron listos para brindarme toda su ayuda, por estar siempre presentes acompañándome para poder realizarme

A mis sobrinos quienes han sido mi motivación, inspiración y mi alegría.

A José (YO SOY) por tu paciencia, comprensión, por apoyarme en todo momento, por ser mi Ángel de la guarda. Ahora puedo decir que esta tesis lleva mucho de ti.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo otorgado mediante 96865/96865.

A mi director de tesis Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez por su apoyo para la realización de este proyecto.

A mis tutores, Dr. José Manuel Cervantes Uc y la Dra. Cristina Piña Barba, Manuel Aguilar por su apoyo, por creer y confiar en mí.

A mis revisores, Dr. Fernando Hernández, Dra. Lerma Chan, Dr. Alejandro Ortiz, Dr. Luís May, por su revisión y comentarios en la tesis.

Dra. Sanjukta Deb, Lucy Di Silvio por apoyo en la realización de las pruebas de Biocompatibilidad.

Dra. Patricia Quintana, Daniel Aguilar por su apoyo en la realización de pruebas de DRX.

A Rossana Vargas, Wilberth Antonio Herrera Kao, Hugo Carrillo Escalante por su apoyo Técnico.

A Alejandra Aimeé Gutiérrez Mejía por su apoyo técnico, sus consejos y su amistad.

A mis compañeros del cubículo Olga, Adrián, Celín, Ena, por su apoyo, por hacerme alegre mis días en el CICY, por sus comentarios que enriquecieron mi trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	i
LISTADO DE FIGURAS	v
LISTADO DE TABLAS	viii
GLOSARIO DE TÉRMINOS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN	xii
Capítulo 1. ANTECEDENTES	1
1.1. Historia de los biomateriales en la medicina	1
1.2. Biomateriales	2
1.3. Hueso	5
1.3.1. Tipos de hueso	6
1.3.2. Componentes del hueso	7
1.3.2.1. Matriz ósea	7
1.3.2.2. Células óseas	8
1.4. Enfermedades óseas.....	9
1.5. Sustitutos Óseos.....	11
1.6. Injertos óseos.....	12
1.6.1. Tipos de injertos	13
1.6.1.1. Autoinjertos	13
1.6.1.2. Aloinjertos	14
1.6.1.3. Xenoinjertos	15
1.6.1.4. Materiales aloplásticos	15
1.7. Regeneración ósea guiada (ROG)	16
1.7.1. Remodelación ósea	17
1.7.2. Factores reguladores del remodelado óseo	19
1.8. Ingeniería de Tejidos	20

1.9.	Polímeros	22
1.9.1.	Polímeros biodegradables	24
1.9.2.	Degradación en polímeros	27
1.9.2.1.	Degradación térmica.....	27
1.9.2.2.	Degradación hidrolítica	28
1.9.2.3.	Biodegradación.....	28
1.9.3.	Poliuretanos (PU)	30
1.9.3.1.	Poliuretanos Segmentados.....	32
1.9.3.2.	Segmento flexible.....	34
1.9.3.3.	Segmento rígido.....	37
1.9.3.3.1.	Isocianatos	37
1.9.3.3.1.1.	Extensores de cadena	39
1.9.3.3.1.2.	L- Glutamina.....	40
1.9.3.3.1.3.	Ácido ascórbico	41
1.10.	Cerámicos	42
1.11.	Polímeros Híbridos.....	43
1.12.	Pruebas de biocompatibilidad.....	44
1.13.	Adelantos en poliuretanos y materiales compuestos híbridos utilizados para la regeneración ósea	45
HIPÓTESIS.....		48
OBJETIVOS		49
Capítulo 2. PARTE EXPERIMENTAL.....		50
2.1.	Materiales	50
2.2.	Síntesis de los poliuretanos urea segmentados (SPU's).....	50
2.2.1.	Síntesis de los materiales compuestos de poliuretanos urea segmentados e hidroxiapatita (Método <i>In situ</i>).....	53
2.2.2.	Síntesis de los materiales compuestos de poliuretanos urea segmentados e hidroxiapatita (Método de Mezcla)	53
2.2.3.	Elaboración de películas.....	54

2.3.	Caracterización fisicoquímica y superficial	54
2.3.1.	Solubilidad.....	54
2.3.2.	Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).....	55
2.3.3.	Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	55
2.3.4.	Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	55
2.3.5.	Difracción de rayos X (DRX).....	55
2.3.6.	Ángulo de contacto.....	55
2.3.7.	Determinación de los pesos moleculares.....	56
2.4.	Caracterización térmica	56
2.4.1.	Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	56
2.4.2.	Análisis Termogravimétrico (TGA)	57
2.4.3.	Análisis Dinámico Mecánico (DMA).....	57
2.5.	Caracterización mecánica.....	57
2.5.1.	Ensayos Mecánicos de Tensión.....	57
2.6.	Estudios de Degradación	58
2.6.1.	Degradación en buffer de fosfato salino.....	58
2.6.2.	Degradación acelerada.....	59
2.6.3.	Degradación enzimática	59
2.7.	Ensayos de citotoxicidad	59
2.7.1.	Cultivo Celular de Osteoblastos <i>in vitro</i>	59
2.7.2.	Ensayos indirectos de citotoxicidad MTT	59
2.7.2.1.	Medio de elución	60
2.7.2.2.	Ensayo MTT	60
2.7.2.3.	Ensayo de Proliferación de células (Alamar Blue TM).....	62
Capítulo 3.	Resultados y Discusiones.....	63
3.1.	Esquema de polimerización.....	63
3.2.	Caracterización química y superficial	64
3.2.1.	Solubilidad de los poli (uretano ureas) segmentados (SPU's)	64
3.2.2.	RMN.....	65
3.2.3.	Determinación de la composición mediante FTIR	67

3.2.4.	Microscopia Electrónica de Barrido	70
3.2.5.	Ángulo de Contacto	73
3.2.6.	Difracción de Rayos X (DRX)	74
3.3.	Propiedades térmicas	76
3.3.1.	Comportamiento térmico determinado por DSC.....	76
3.3.2.	Análisis termogravimétrico (TGA)	78
3.3.3.	Análisis Mecano Dinámico (DMA)	81
3.4.	Determinación de la masa molecular.....	84
3.5.	Caracterización mecánica	85
3.5.1.	Ensayo a tensión	85
3.6.	Degradación.....	88
3.6.1.	Degradaciones aceleradas.....	88
3.6.1.1.	Pérdida de masa	88
3.6.2.	Degradaciones en Buffer (PBS)	89
3.6.2.1.	Caracterización por FTIR de los productos de degradación en PBS.....	91
3.6.2.2.	Peso molecular de los productos de degradación en buffer (PBS).....	93
3.6.3.	Degradaciones enzimáticas.....	94
	Tripsina.....	94
	Ureasa	94
3.6.3.1.	Absorción de agua y pérdida de masa	95
3.6.3.2.	Caracterización por FTIR de los productos de degradación enzimática ..	97
3.6.3.3.	Peso molecular de los productos de degradación enzimática.....	99
3.7.	Biocompatibilidad	100
3.7.1.	Ensayo de MTT	100
3.7.2.	Alamar Blue.....	101
	Conclusiones.....	104
	Perspectivas.....	106
	Anexos.....	107
	BIBLIOGRAFIA	110

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. 1 Diferentes implantes óseos del área de los Biomateriales ³	3
Figura 1. 2 Tejidos u órganos dañados que se puede restaurar por implantación de prótesis o de órganos ²	4
Figura 1. 3 Organización estructural del hueso ²⁵	7
Figura 1. 4 Células del hueso ²⁶	8
Figura 1. 5 Patologías de la pérdida de continuidad ósea. a) artrosis b) tumor. ^{30, 31}	10
Figura 1. 6 Diferentes aproximaciones para la sustitución de un tejido u órgano dañado ²	14
Figura 1. 7 Hueso inorgánico (xenoinjerto). NUKBONE. ⁴¹	15
Figura 1. 8 Tipos de membrana utilizadas en la Regeneración Ósea	16
Figura 1. 9 Esquema del ciclo de remodelación hueso y reabsorción del hueso ⁴⁶	18
Figura 1. 10 Factores reguladores de remodelación ósea ⁴⁸	20
Figura 1. 11 Esquema simplificado del concepto de Ingeniería de Tejidos. ^{21, 50}	21
Figura 1. 12 Modelo de migración celular en andamios ⁵³	22
Figura 1. 13 Proceso de biodegradación de polímeros ⁶⁷	29
Figura 1. 14 Reacción básica para la síntesis de un poliuretano ⁶⁸	30
Figura 1. 15 Reacciones principales de los poliuretanos segmentados para aplicaciones médicas ⁵⁷	32
Figura 1. 16 Reacciones colaterales durante la síntesis de poliuretanos ⁵⁷	33
Figura 1. 17 Modelos morfológicos de mezcla de fases: segmento flexible y segmento rígido ⁵⁷	34
Figura 1. 18 Estructura de la PCL diol	36
Figura 2. 1 Estructuras de los monómeros para la síntesis de SPU's, a) PCL diol, b) HMDI, c) Ácido ascórbico d) L-Glutamina.....	51
Figura 2. 2 Mecanismos sugeridos para la formación de poli (uretano-ureas) preparados con ácido ascórbico (AA) y glutamina /GL). a) Formación del polímero lineal y b) Formación del polímero entrecruzado.....	52
Figura 2. 3 Esquema de preparación de película para su caracterización	54
Figura 2. 4 Método de la gota para la determinación del ángulo de contacto	56

Figura 2. 5 Reducción de MTT	61
Figura 3. 1 Espectros ¹ H RMN de SPUAA y SPUGL	66
Figura 3. 2 Espectros de FTIR de SPU's in situ (a) y (c) en mezcla (b) y (d) 10,15 y 20% Ha.....	68
Figura 3.3 Posibles interacciones entre cadenas en poli(uretano-Urea) segmentados elástomericos.....	69
Figura 3.4 Vista superficial de películas del método <i>in situ</i> obtenidas por evaporación de THF en un molde de teflón.....	71
Figura 3.5 Vista superficial de películas del método mezcla obtenidas por evaporación de THF en un molde de teflón.....	72
Figura 3. 6 Difractogramas de poliuretanos puros y materiales compuestos (<i>in situ</i>) a y c,(mezcla) b y d.....	75
Figura 3. 7 Termogramas del DSC de poliuretanos puros y los materiales compuestos a y c (método <i>in situ</i>) b y d (método mezcla).....	77
Figura 3. 8 Termogramas del TGA de poliuretanos puros y sus compuestos con hidroxiapatita. a) b) c) y d) es la derivada de la masa residual y a') b') c') y d') porcentaje de la masa residual utilizando AA y GL como extensor de cadena.....	80
Figura 3. 9 Termogramas del DMA de poliuretanos puros y sus compuestos con hidroxiapatita. a,a'y b,b' Módulo de almacenamiento vs. Temperatura.	82
Figura 3. 10 Termogramas del DMA de poliuretanos puros y sus compuestos con hidroxiapatita. c,c'y d,d' Módulo de almacenamiento vs. Temperatura	83
Figura 3. 11 Absorción de agua (a) y pérdida de masa (b) de SPU sintetizados con ácido ascórbico y glutamina.....	90
Figura 3. 12 Espectros de Infrarrojo de la degradación en PBS de los SPUAA y SPUGL puros a 30, 60, 90 y 120 días.	92
Figura 3. 13 Absorción de agua y pérdida de masa de SPUAA y SPUGL durante su degradación enzimática con tripsina y ureasa	96
Figura 3. 14 Espectros de infrarrojo de AA-0 y GL-0 sometidos a degradaciones con tripsina y ureasa	98

Figura 3. 15 Viabilidad de células osteoblásticas de extractos de SPU's por ensayos de MTT.....	101
Figura 3. 16 Viabilidad de células osteoblásticas de SPU AA-0, AA-I-20% GL-0 y GL-I-20% por Alamar Blue.....	103
Figura A. 1 .Espectro de Infrarrojo de la hidroxiapatita pura	107
Figura A. 2 Termograma de la PCL.	107
Figura A. 3.-Difractograma de Rayos X de policaprolactona pura (Aldrich)	108
Figura A. 4 Difractograma de Rayos X de la hidroxiapatita.....	109

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. 1 Composición del hueso ²²	6
Tabla 1. 2 Poliésteres Biodegradables ⁴²	26
Tabla 1. 3 Polioles como segmentos flexibles. ⁵⁷	35
Tabla 1. 4 Diisocianatos típicos usados en la síntesis de poliuretanos elastoméricos ^{80, 93} ..	38
Tabla 2. 1 Aminoácidos utilizados en la síntesis de los poli (urea-uretanos) segmentados .	50
Tabla 2. 2 Nomenclatura de los poliuretanos obtenidos (<i>in situ</i> y mezcla).....	53
Tabla 3. 1 Solubilidad de poliuretanos con diferentes disolventes.....	65
Tabla 3. 2 Ángulo de contacto.....	74
Tabla 3. 3 Pesos moleculares de poliuretanos y materiales compuestos.....	85
Tabla 3. 4 Propiedades mecánicas de los materiales compuestos con ácido ascórbico	87
Tabla 3. 5 Propiedades mecánicas de los materiales compuestos con glutamina	87
Tabla 3. 6 Degradaciones aceleradas de poliuretanos preparados con ácido ascórbico y glutamina y sus materiales compuestos con HA	89
Tabla 3. 7 Variación del peso molecular de AA-0 y GL-0 durante la degradación en PBS	93
Tabla 3. 8 Variación del peso molecular de los AA-0 y GL-0 después de la degradación enzimática.....	99
Tabla A. 1 Propiedades térmicas de los poliuretanos.....	109

GLOSARIO DE TÉRMINOS

AA	Ácido ascórbico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN m	Ácido Ribonucleico mensajero
HOB	Human osteoblasts, por sus siglas en inglés
DMA	Análisis dinámico mecánico
DMF	Dimetil formamida
DRX	Difracción de rayos X
DSC	Calorimetría diferencial de barrido por sus siglas en inglés
FTIR	Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier
GPC	Cromatografía de permeación en gel
GL	Glutamina
HMDI	4,4'-metilen bis (ciclohexildiisocianato)
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio
Oct-sn	Octanoato de estaño ó Estaño II etil hexanoato
PBS	Buffer de fosfato salino
PCL	Policaprolactona
PU's	Poliuretanos
rpm	revoluciones por minuto
RMN	Resonancia magnética nuclear
SPU's	Poliuretanos segmentados por sus siglas en inglés
TGA	Análisis termogravimétrico
THF	Tetrahidrofurano
VCR	Viabilidad celular relativa
Xc	Cristalinidad relativa

RESUMEN

Los poliuretanos segmentados fueron sintetizados con poli (ϵ - caprolactona) diol, 4,4' metilen bis (ciclohexil isocianato) (HMDI) y compuestos osteogénicos tales como el ácido ascórbico (AA) o glutamina (GL) como extendedor de cadena. Materiales compuestos fueron preparados por adición de 20% en masa de hidroxiapatita (HA) durante la formación del prepolímero o por mezcla física en THF y caracterizados por diferentes técnicas fisicoquímicas y mecánicas. La Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) y la Resonancia Magnética Nuclear de Protones (^1H NMR) revelaron la formación de enlaces uretanos y urea. Las propiedades de los poliuretanos mostraron poca variación con el extendedor de cadena usado y en general fueron polímeros semicristalinos ($T_g = -25\text{ }^\circ\text{C}$, $T_m = 51.4\text{-}53.8\text{ }^\circ\text{C}$, $2\theta = 21.3^\circ$ y 23.4°) según lo revelado por Análisis Mecánico Dinámico (DMA), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y por Difracción de Rayos X (XRD); por su parte, las pruebas a tensión relevaban un comportamiento de elastómero ($\epsilon > 1000\%$). La cristalinidad de los materiales compuestos preparados con ácido ascórbico como extensor de cadena se redujo ligeramente cuando la HA fue incorporada por mezcla física (de 38% a 31%). La T_g disminuyó hasta $-37\text{ }^\circ\text{C}$ en tanto que la deformación a la ruptura fue reducida hasta 29%-36 %, también por la adición de la HA después de la formación de los poliuretanos. Los materiales compuestos preparados con ácido ascórbico como extendedor de cadena mostraron módulos de Young y una resistencia a la tensión más altos que en los materiales compuestos preparados con glutamina cuando la HA fue incorporada durante la formación del prepolímero. Los análisis de SEM revelaron una dispersión pobre de HA en los materiales compuestos obtenidos mediante la incorporación de HA a través de mezcla física, en comparación con los SPU's donde la HA fue adicionada durante la formación del pre polímero se logró una buena dispersión de la misma.

Los estudios de biocompatibilidad mostraron que los SPU's que contienen ácido ascórbico lograron la proliferación de osteoblastos alveolares, incrementando su potencial de este polímero para la regeneración de tejido óseo.

ABSTRACT

Segmented polyurethanes were synthesized from poly(ϵ -caprolactone)diol, 4,4'-methylen bis cyclohexyl isocyanate (H_{12} MDI) and osteogenic compounds such as ascorbic acid (AA) or glutamine (GLU) as chain extenders. Dense composites were prepared by adding 20 wt.% of hydroxypapatite (HA) either during prepolymer formation or by physical mixing in THF (Tetrahydrofuran) and characterized by various physicochemical and mechanical techniques. Fourier Transformed Infrared spectroscopy (FTIR) and Proton Nuclear Magnetic Resonance (1H NMR) revealed the formation of urethanes and urea linkages. The properties of synthesized polyurethanes showed little variation with the chain extender used and in general they were semicrystalline polymers ($T_g = -25^\circ C$; $T_m = 51.4-53.8^\circ C$; $2\theta = 21.3^\circ$ and 23.4°) as revealed by Dynamic Mechanical Analysis (DMA), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and X-ray diffraction (XRD) with an elastomeric behavior ($\epsilon > 1000\%$). The addition of HA only slightly reduced the crystallinity of the composites prepared with ascorbic acid as chain extender when HA was incorporated by physical mixing (from 38% to 31%). Both T_g of composites and the strain to break were reduced up at $-37^\circ C$ and 29-36% respectively also by HA addition after polyurethane formation. Composites prepared with ascorbic acid as chain extender showed higher Young's modulus and tensile strength than composites prepared with glutamine when HA was incorporated during prepolymer formation. SEM analysis revealed a poor dispersion in the dense HA composites obtained by incorporating HA through physical mixing, compared with SPU's where HA was added during prepolymer formation. Biocompatibility studies showed that SPU's containing ascorbic acid allow alveolar osteoblasts proliferation increasing their potential for bone tissue regeneration.

INTRODUCCIÓN

A finales del siglo XIX, y a lo largo del siglo XX, se incrementó el número y variedad de polímeros, consiguiendo desarrollar materiales de gran importancia en la ingeniería de tejidos. En los últimos años, la creciente demanda de materiales para su utilización en el campo de la biomedicina ha aumentado el interés en la síntesis de mejores productos y sus propiedades.

Actualmente existen numerosos polímeros utilizados en el campo biomédico, algunos de ellos son estables y se utilizan para aplicaciones permanentes; sin embargo, en los últimos años se han ido desarrollando polímeros biodegradables para aplicaciones temporales. En este sentido, se están desarrollando una gran variedad de materiales que pueden ser diseñados para promover la regeneración ósea y este es uno de los campos en los cuales la Ingeniería de Tejidos está enfocando numerosos esfuerzos.

Entre los biomateriales que pueden emplearse en la regeneración ósea se encuentran los polímeros sintéticos, los polímeros naturales, los biocerámicos, los materiales híbridos, y los bioactivos entre otros. Sin embargo, existe un gran interés en el estudio de materiales compuestos a base de sistemas poliméricos y cerámicos, ya que estos sistemas combinan una serie de propiedades que dan origen a materiales con mejores propiedades. Dentro los polímeros sintéticos se encuentran los poliuretanos segmentados los cuales son biomateriales ampliamente estudiados en aplicaciones vasculares y ortopédicas, debido a sus propiedades mecánicas aceptables y a una adecuada biocompatibilidad. Además, pueden tener la capacidad de degradarse dentro del cuerpo ya sea en sus segmentos rígidos o en los suaves gracias a reacciones de hidrólisis bajo condiciones fisiológicas y posteriormente a eliminarse por vías metabólicas.

Los poliuretanos segmentados (SPU's) son preparados a partir de tres compuestos: un diisocianato, un extendedor de cadena y un macroglicol. Estos reaccionan para formar copolímeros segmentados lineales consistiendo en un segmento rígido (SR) y un segmento flexible (SS). Al adicionarle hidroxapatita (HA) a los poliuretanos segmentados (SPU's) se forma un material compuesto (SPU's/ HA), con características osteoconductoras para la

regeneración del sistema óseo. La hidroxiapatita sintética ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) puede formar una unión estable con el tejido óseo, teniendo buena biocompatibilidad y osteoconductividad. Estos materiales pueden ser invadidos por el tejido conectivo proveniente del hueso circundante para posteriormente osificarse, manteniendo en su interior las características macro porosas originales.

En este trabajo se propone la síntesis de materiales compuestos con hidroxiapatita (SPU/HA), incorporando la HA como refuerzo bioactivo por dos métodos; en el primero, la HA será incorporada durante la formación del prepolímero (método *in situ*), y en el segundo, después de haber obtenido el poliuretano, se adiciona la hidroxiapatita y se dispersa utilizando THF (método de mezcla). Como extendedores de cadena se utilizarán el ácido ascórbico (necesario para la formación de colágeno) o la glutamina (necesario para el crecimiento de osteoblastos).

Por lo tanto, los objetivos propuestos para esta tesis incluyeron la obtención de nuevos poli (uretano- urea)s, su caracterización fisicoquímica y mecánica, estudios de degradación *in vitro* y su evaluación biológica para su potencial aplicación en la regeneración ósea.

Esta tesis se encuentra estructurada con la presente introducción, hipótesis, objetivos y tres capítulos. El capítulo 1 contiene los antecedentes acerca de los beneficios y desventajas de los materiales usados actualmente como injertos óseos, los requerimientos y el potencial de los poliuretanos para su uso en ingeniería de tejidos, así como las diferentes aproximaciones para el mejoramiento de éstos. El capítulo 2 comprende la metodología empleada en la síntesis y caracterización de los poli (uretano-urea)s, las degradaciones llevadas a cabo y la evaluación biológica. En el capítulo 3 se presentan los resultados obtenidos y se discuten los factores involucrados en las propiedades elastoméricas obtenidas. En este capítulo, también se discute el efecto sobre las propiedades fisicoquímicas y superficiales ante diferentes agentes degradantes y, finalmente el desempeño biológico de cada poliuretano obtenido. En conclusión el SPU's /HA preparados *in situ* preparado con L- Ascórbico mostró ser superior en términos mecánicos ya que mantuvo altos niveles de esfuerzo y módulo elástico; siendo el ácido ascórbico el que mantuvo mayor adhesión, proliferación y viabilidad celular comparado con AA/HA *in situ*, sugiriéndolo como candidato para ser utilizado en el diseño de injertos mediante ingeniería de tejidos.

Capítulo 1. ANTECEDENTES

1.1. Historia de los biomateriales en la medicina

La utilización de materiales en medicina, para ayudar a restaurar las funciones de tejidos dañados, se remontan al uso de ciertos metales y otros productos naturales en el antiguo Egipto y durante las civilizaciones clásicas griega y romana. En Europa, en el siglo XVI, el oro y la plata se emplearon en reparaciones dentales y, posteriormente, el hierro para la inmovilización de fracturas óseas. A lo largo del siglo XIX se desarrollaron diversas aleaciones con mejores propiedades mecánicas y más resistentes a la corrosión. El desarrollo de los polímeros se aceleró a principios del siglo XX con el descubrimiento de materiales para fabricar hilos de sutura capaces de ser degradados y absorbidos por el organismo. La investigación sistemática sobre los materiales tolerables por el organismo para la fabricación de prótesis e implantes se impulsó después de la segunda Guerra Mundial por la necesidad de rehabilitar a los inválidos de guerra. Avances en otros terrenos también han colaborado al desarrollo de ciertos biomateriales, así como al diseño de otros nuevos; entre ellos, se podría destacar el conocimiento de los procesos biológicos desencadenados como consecuencia del contacto de la materia viva con el biomaterial, la identificación y uso de antibióticos disminuyendo el riesgo de infecciones y los adelantos en la práctica quirúrgica.

La descripción de nuevos biomateriales y sistemas utilizados en Medicina, que sean fisiológicamente eficaces y mecánicamente funcionales, ha sido vertiginosa. En un recorrido a través de los años 1940 y 1950, la investigación y el desarrollo de los implantes se realizó casi exclusivamente por cirujanos; algunos de los implantes concebidos en esa época todavía se utilizan, como por ejemplo el implante o prótesis de cadera de Charley¹. Entre 1950 y 1975, las características de los biomateriales para implantes y prótesis se determinaban por integridad de los mismos tras su implantación a largo tiempo, su naturaleza no tóxica y la respuesta inflamatoria. El año 1969 marca el punto de partida de la necesaria incorporación a la medicina de diversas disciplinas para el desarrollo de biomateriales. Así el ingreso de la Ingeniería permitió introducir técnicas para caracterizar la estructura y la superficie de los

biomateriales y, el de otras ciencias entre las que se puede mencionar la Biología, Bioquímica, Química, Biología Celular, etc., y el estudio de la respuesta celular. De 1975 a 2000 los estudios se centraron en el conocimiento más exhaustivo de las interacciones biológicas tejido-biomaterial, con la incorporación de técnicas de Biología Molecular y, más recientemente, la Ingeniería Tisular^{2, 3}.

En las pasadas décadas se han desarrollado nuevos materiales basados en componentes sintéticos y biológicos, conocidos como materiales “biomiméticos”(las características de los diseños intentan replicar los procesos biológicos básicos de los diferentes tejidos)^{2, 4}. En el caso del sistema óseo, estos nuevos conceptos generan ideas en tejido mineralizados muy abundantes tales como los biohíbridos o productos de combinación (se denomina material híbrido a cualquier material orgánico-inorgánico en que por lo menos uno de los componentes, está presente con un tamaño de orden nanométrico)^{5, 6}, que los hace compatibles o afines a sistemas biológicos. Por ejemplo, implantes dentales, implantes ortopédicos utilizados para soportes de carga, cementos óseos, disco de columna, articulación de cadera, hombro y rodilla. La interacción entre biomateriales y tejido circundante es una de las principales preocupaciones para elegir el material adecuado para los andamios. Aunque los requisitos dependen de la naturaleza de la aplicación, de acuerdo a la literatura un polímero biocompatible está fuertemente influenciado por la concentración interfacial de los grupos funcionales, energía libre, hidrofilia de la superficie, grado de cristalinidad y topografía del polímero^{7, 8}. Actualmente, el elevado número de accidentes, desastres naturales y ciertas enfermedades continúan influyendo, tanto en la práctica de la medicina como en el desarrollo de áreas de investigación centradas en la búsqueda de nuevos materiales para la sustitución de órganos dañados.

1.2. Biomateriales

Un biomaterial es cualquier sustancia o combinación de sustancias de origen natural o sintético, diseñadas para interactuar con sistemas biológicos con el fin de evaluar, tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del organismo humano. Atendiendo a su origen, los biomateriales pueden ser naturales o sintéticos. Los naturales en general son más complejos, heterogéneos y difíciles de caracterizar. Algunos ejemplos incluyen a las

proteínas, como el colágeno. Por su parte los biomateriales sintéticos pueden ser metales, cerámicos, poliméricos o materiales compuestos⁹. En la figura 1.1 se observa un esquema donde se pretende explicar cómo se conciben los implantes óseos (hidroxiapatita), su constitución, su fabricación, compatibilidad, funcionamiento, teniendo en cuenta de donde provienen y que los implantes óseos son solo una parte del área de los biomateriales.

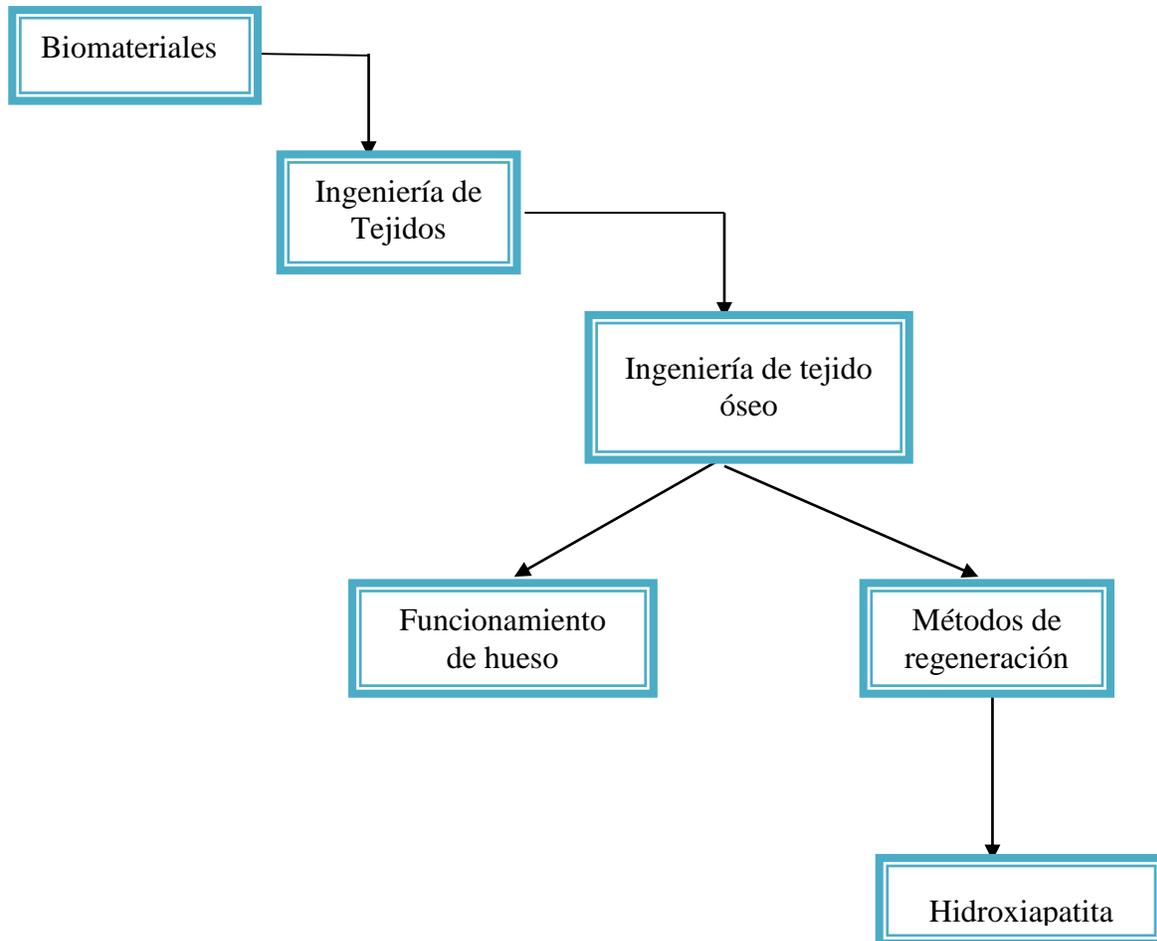


Figura 1. 1 Diferentes implantes óseos del área de los Biomateriales³.

Los biomateriales poliméricos (ver Figura 1.2), se pueden clasificar según el tiempo que deben mantener su funcionalidad cuando se aplican como implantes. En el primer grupo se incluyen los biomateriales bioestables, es decir todos aquellos implantes que deben tener carácter permanente, como los sistemas o dispositivos para sustituir parcial o totalmente un tejido u órgano a consecuencia de un trauma o enfermedad. En el segundo grupo se incluyen

los biomateriales degradables de aplicación temporal, es decir, aquellos que deben mantener su funcionalidad durante un periodo de tiempo limitado ya que el organismo es capaz de regenerar el tejido afectado.¹⁰⁻¹²

Desde el punto de vista de su función, algunos biomateriales que contienen drogas son considerados medicamentos; los que incluyen células vivas constituyen los denominados “biomateriales híbridos”. También hay “biomateriales inteligentes” que incluyen compuestos capaces de responder a ciertos estímulos.^{2, 13}

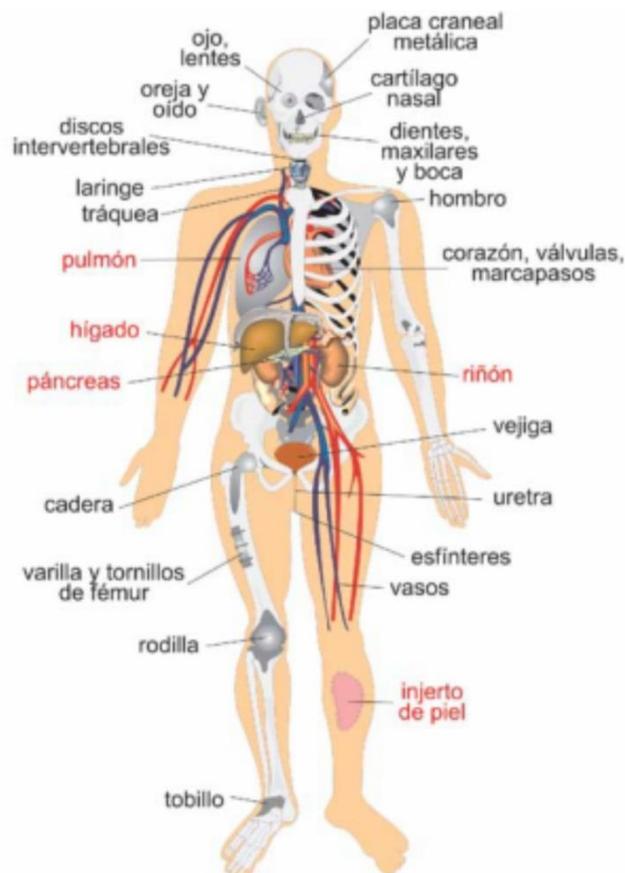


Figura 1. 2 Tejidos u órganos dañados que se puede restaurar por implantación de prótesis o de órganos².

Para asegurar el éxito de un nuevo biomaterial se requiere que éste supere una serie de ensayos que preceden a las pruebas clínicas: simulaciones biomecánicas, modelos *in vitro*, ensayos toxicológicos de biocompatibilidad e implantación en animales de experimentación.

El biomaterial no debe ser tóxico ni carcinógeno; debe ser químicamente estable, o por lo contrario biodegradarse en productos no tóxicos, al menos durante el tiempo programado, además debe poseer propiedades mecánicas adecuadas, características superficiales, donde la resistencia a la fatiga, y el peso molecular deben ser los correctos². A todo ello debe añadirse que el precio debe ser reducido, su fabricación reproducible y fácil su procedimiento de producción a gran escala¹.

1.3. Hueso

El tejido óseo se mantiene en un estado dinámico de constante remodelación y permite la renovación de 5-10% del hueso por año, como consecuencia de su función de soporte estructural^{14, 15 16}. Desempeña diversas funciones en el organismo, en primer lugar es la principal reserva de calcio del cuerpo, que intercambia con los fluidos extracelulares actuando como factor regulador de la concentración de calcio en los fluidos corporales, manteniendo el equilibrio necesario para el correcto funcionamiento de algunos procesos fisicoquímicos vitales¹⁴. En segundo lugar, la médula ósea suministra al organismo los glóbulos rojos que actúan como portadores de nutrientes para las células, tejidos, órganos y los glóbulos blancos por lo que son fundamentales para el sistema inmunológico¹⁷. El tercer papel que desempeña el tejido óseo es una función mecánica de soporte de los tejidos corporales (mantiene la forma y protege a los órganos internos), proporcionando además puntos de sujeción de los músculos, responsables de la locomoción y movimiento corporal¹⁴. Recientemente, también se ha reportado su papel en la regulación del azúcar¹⁸.

El hueso es un tejido complejo donde las células se unen con compuestos orgánicos y minerales en la matriz. En el hueso, la matriz extracelular está compuesta principalmente de colágeno tipo I (30 %), reforzado con cristales de hidroxiapatita, HA (fosfato de calcio), aunque se encuentran también otros fosfatos de calcio como la whitlockita y fosfato octacálcico¹⁹. Químicamente los huesos se componen de agua, de minerales como sales de calcio y de materia orgánica (proteínas y colágeno). El calcio, su principal componente, es un mineral que no solo es necesario para darle fortaleza y dureza al hueso, sino que también es primordial para promover otros procesos como el producir nuevas células sanguíneas. El colágeno tipo I es importante y abundante en la composición de la matriz, proporcionándole

flexibilidad y también se utiliza para la regeneración ósea debido a la proliferación y diferenciación de osteoblastos. En la tabla 1.1 se muestran los componentes principales del tejido óseo²⁰⁻²²

Tabla 1. 1 Composición del hueso²²

Componentes	Contenido (% en peso)
Mineral (fosfatos y carbonatos de calcio)	45
Orgánica (Proteína y Colágeno)	30
Agua	25

El tejido óseo es uno de los tejidos más resistentes y rígidos del cuerpo humano, es un tejido altamente mineralizado, muy vascularizado e innervado. En este tejido, las fibras de colágeno contribuyen principalmente a la elasticidad del hueso, pero igualmente a la resistencia del mismo²¹. Desde un punto de vista macroscópico el hueso maduro se da de las formas cortical o compacto y hueso trabecular o esponjoso. La diferencia fundamental entre ambos está en la orientación espacial de los elementos orgánicos y minerales, así como en la composición orgánica como mineral.

1.3.1. Tipos de hueso

El hueso compacto (hueso cortical). Constituye la mayor parte de la diáfisis de los huesos largos así como de la parte externa de todos los huesos del cuerpo. El hueso compacto constituye una protección y un soporte. Es más denso que el hueso trabecular y está formado por unidades cilíndricas paralelas denominadas osteonas o sistemas haversianos. El hueso cortical es anisotrópico y la direccionalidad de las osteonas determina en gran medida la direccionalidad de sus propiedades mecánica¹¹. Los canales de Havers están conectados con otros canales llamados canales de Volkmann que perforan el periostio. Ambos canales son utilizados por los vasos sanguíneos, linfáticos y nervios para extenderse por el hueso. Entre

las láminas concéntricas de matriz mineralizada hay pequeños orificios donde se encuentran los osteocitos²⁰.

Hueso esponjoso. A diferencia del hueso compacto, el hueso esponjo no contiene osteonas, sino que las láminas intersticiales están dispuestas de forma irregular formando unos tabiques o placas llamadas trabéculas. Estos tabiques forman una estructura esponjosa dejando huecos que están llenos de la médula ósea roja. Dentro de las trabéculas están los osteocitos que están en sus lagunas con canalículos que irradian desde las mismas. En este caso, los vasos sanguíneos penetran directamente en el hueso esponjoso y permiten el intercambio de nutrientes con los osteocitos. El hueso esponjoso es el principal constituyente de las epífisis de los huesos largos y del interior de la mayor parte de los huesos²⁰. (Ver figura 1.3).

1.3.2. Componentes del hueso

1.3.2.1. Matriz ósea

La matriz orgánica o sustancia osteoide representa un tercio del peso óseo. Está formada por proteínas, glicoproteínas, ácido hialurónico, elastina, fibrina²¹ y colágeno tipo I, III, V, XII (90%).²³ La matriz juega un papel importante en el sistema óseo como reservorio de calcio y fósforo, ya que constituye una reserva de proteínas que participan en la diferenciación celular, la integridad y función del tejido óseo^{14, 21, 23, 24}.

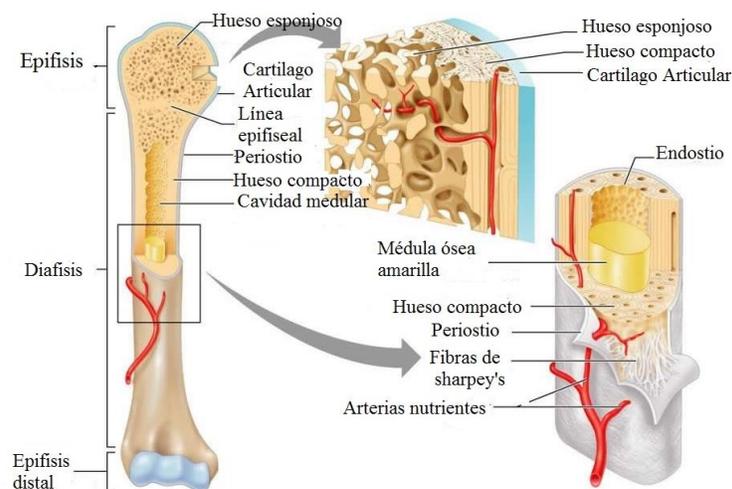


Figura 1. 3 Organización estructural del hueso²⁵

1.3.2.2. Células óseas

Osteoblastos.- Sintetizan la matriz orgánica o sustancias osteoide y expresan una enzima, la fosfatasa alcalina, que permite la mineralización. Sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso. Dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, median la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos y sintetizan factores de crecimiento (ver figura 1.4).

Osteocito.- Son células óseas maduras derivadas de los osteoblastos que constituyen la mayor parte del tejido óseo. Al igual que los osteoblastos han perdido la capacidad de dividirse. Los osteocitos no segregan materiales de la matriz ósea y su función es la mantener las actividades celulares del tejido óseo como el intercambio de nutrientes y productos de desecho.

Osteoclastos.- Son células derivadas de monocitos circulantes que se asientan sobre la superficie del hueso y se encargadas de la reabsorción del hueso.

Debido a que el hueso es dinámico se forma, se regenera y se reabsorbe, con la edad se van presentando diversas enfermedades.

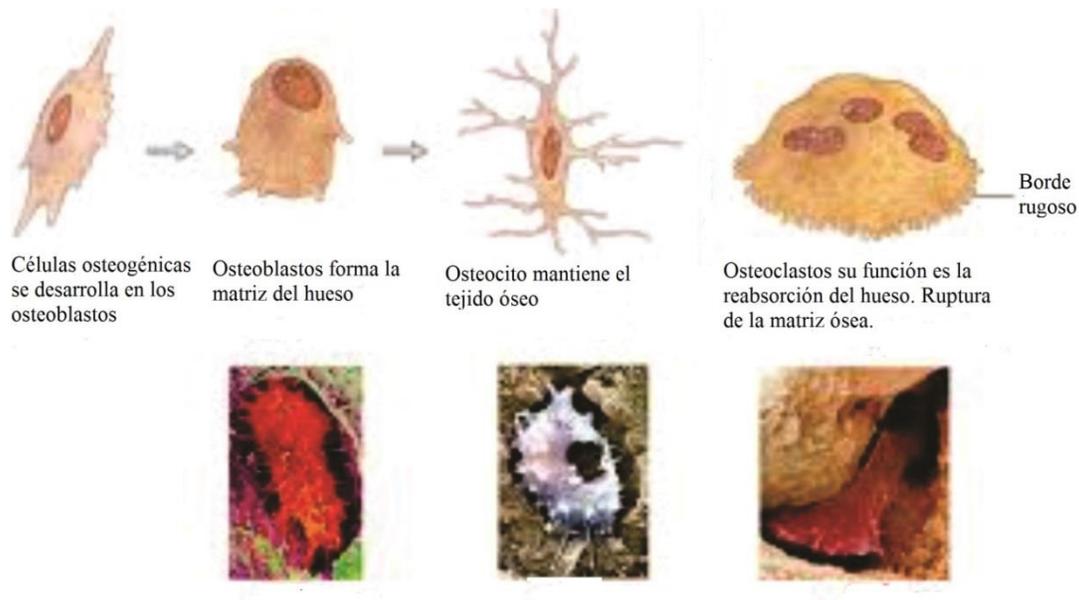


Figura 1. 4 Células del hueso²⁶

1.4. Enfermedades óseas

Actualmente, con el ritmo de la vida moderna cada vez son más frecuentes los accidentes que sufre el ser humano principalmente en el sistema musculo esquelético, provocando pérdida en la continuidad ósea. Simultáneamente a estos traumatismos, el hombre también ha desarrollado nuevas alternativas para curarse y regenerar los tejidos dañados.¹

Por lo general, la lesión pasa por un proceso de cicatrización o reparación llamado consolidación ósea (formación de tejido de granulación, callo blando, callo duro y remodelación). Sin embargo, adicionalmente a los traumas, los tumores, malformaciones congénitas, periodontitis en odontología, artritis, pseudoartrosis y artrodesis son algunas patologías donde la pérdida de continuidad ósea rebasa la capacidad de consolidar adecuadamente en tiempo y forma²⁷. A continuación, se describen algunas de estas enfermedades (Figura 1.5).

Tumores. La incidencia de tumores óseos benignos es relativamente baja; en estudios epidemiológicos fiables es de 1/100 000 habitantes para el sexo masculino y de 0.7/100 000 para el femenino²⁸ Los tumores óseos benignos presentan células que tienden a la maduración y a la diferenciación, generalmente están bien definidos respecto a los tejidos de la vecindad. Una resección completa garantiza su curación. Los tumores óseos malignos son sarcomas que presentan propensión a crecer de modo rápido y desordenado, infiltrando a los órganos vecinos, con tendencia a la diseminación a distancia en forma de metástasis¹³.

Pseudoartrosis. Es la falta de consolidación ósea definitiva de una fractura; la pseudoartrosis es un proceso patológico que corresponde a la formación de una cicatriz por medio de un tejido fibroso no osificado, el proceso es irreversible y definitivo. Aunque el tejido cicatricial es normal, la alteración patológica se presenta cuando no hay integración osteoblástica que le confiera al tejido cicatrizal fibroso características de tejido óseo²⁷

La osteoporosis y la artrosis son las dos enfermedades óseas crónica degenerativa de mayor prevalencia, en los últimos años se ha señalado la posibilidad de que ambos procesos coexistan e incluso guarden una relación directa entre ambos procesos dificultado por varios factores en primer lugar, cuando la artrosis afecta a articulaciones de carga,

fundamentalmente cadera y rodilla. En segundo lugar, pueden estar presentes algunas circunstancias que influyan en ambos procesos, como, por ejemplo, la deficiencia estrogénica factor de riesgo bien conocido de osteoporosis, que parece contribuir también a la degeneración del cartílago articular.

La enfermedad de los huesos de cristal, u osteogénesis imperfecta (OI) es un trastorno genético y hereditario que se caracteriza porque los huesos de las personas que lo padecen se rompen con facilidad, luego de sufrir un traumatismo mínimo e incluso sin causa aparente.

Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria sistemática crónica, que afecta de modo principal las membranas sinoviales de múltiples articulaciones como extra articulares y está determinada de manera genética; también puede asociarse a la edad avanzada, obesidad y traumatismos, (Ver figura 1.5).

Periodontitis. Es una inflamación e infección de los ligamentos y huesos que sirven de soporte a los dientes. La periodontitis ocurre cuando la inflamación o la infección de las encías (gingivitis) se deja sin tratamiento o cuando el tratamiento se demora. Dicha infección e inflamación se disemina desde las encías (gingival) hasta los ligamentos y el hueso que sirven de soporte a los dientes. La pérdida de soporte hace que los dientes se aflojen y finalmente se caigan. La periodontitis es la causa principal de la caída de los dientes en los adultos. No es un trastorno común en la niñez, pero se incrementa durante la adolescencia²⁹.



Figura 1. 5 Patologías de la pérdida de continuidad ósea. a) artrosis b) tumor.^{30, 31}

1.5. Sustitutos Óseos

Generalmente se requiere un sustituto de hueso para ayudar o completar la reparación de una deficiencia esquelética debida a trauma, tumores o desarrollo anormal, y así restaurar la función normal del tejido. Los biomateriales pueden utilizarse como sustitutos del injerto de hueso autólogo. Dentro de las cerámicas utilizadas se encuentra la hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_x(\text{HPO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-}$, principal componente inorgánico del hueso de los vertebrados; también la encontramos en la dentina y el esmalte dental. La biocompatibilidad de la hidroxiapatita sintética ha sido sugerida no solo por su composición sino por los resultados obtenidos en su implantación *in vivo*, los cuales han demostrado ausencia de toxicidad local o sistémica, no provocando inflamación o respuesta a cuerpo extraño. También se han empleado factores de crecimiento óseo, sustancias naturales presentes en el hueso y que pueden promover su formación, inicialmente llamados ontogénicos o, desde entonces, conocidos como BMP (por Bone Morphogenetic Proteins).

La necesidad de tratar defectos óseos de diferentes etiologías, magnitud y localización ha estimulado enormemente la búsqueda y desarrollo de materiales capaces de sustituir al hueso. El sustituto óseo debería ser osteogénico, biocompatible, bioabsorbible, capaz de proporcionar soporte estructural y de transportar otras sustancias³², fácilmente utilizable en clínica y con una adecuada relación costo beneficio³³. El empleo de sustitutos óseos ha sido una alternativa para la reparación del hueso. El sustituto óseo ideal debe ser estéril, no tóxico, aceptable inmunológicamente y disponible en cantidades suficientes. El sustituto óptimo debería ser capaz de inducir la diferenciación de células locales a células formadoras de hueso y al mismo tiempo proporcionar un andamio conductivo, gradualmente reabsorbible para la formación de nuevo hueso

Denominamos sustitutos óseos a todos los tejidos o materiales que pueden emplearse para rellenar defectos del hueso, con el objetivo de obtener la regeneración y reparación del tejido óseo, ya sea con la parte orgánica o la inorgánica^{1,12,34}.

1.6. Injertos óseos.

El injerto óseo es utilizado en pequeños defectos localizados de cresta ósea alveolar en combinación con la técnica de Regeneración Ósea Guiada (ROG)³⁵

Los injertos más utilizados actualmente son hueso del mismo paciente (autólogo) o hueso de cadáver (allogénico). Se han realizado investigaciones con diferentes materiales incluyendo biológicos, polímeros, cerámicos y combinaciones de estos; el objetivo es encontrar el producto ideal que reemplace y elimine los problemas relacionados con la disponibilidad, la biocompatibilidad y la transmisión de enfermedades. Adicionalmente, el material utilizado en la ROG debe actuar como una barrera mecánica para el crecimiento de tejido fibroso o la interposición de músculo en el defecto óseo.

Los injertos óseos tienen doble función mecánica y biológica³⁶ ya que en la interface injerto óseo-huésped existe una compleja relación destacando dentro de ellos la zona del implante, vascularización del injerto, interface hueso-huésped, factores locales y sistemáticos diversos (hormonales, usos de medicamento, calidad ósea, enfermedades crónicas degenerativas) y propiedades mecánicas (que dependen del tamaño, forma y tipo de injerto utilizado)^{28 37}

La idea de trasplantar una parte de un organismo sin vida a otro vivo y/o enfermo ha sido objeto de múltiples intentos durante décadas. Después de la sangre, el hueso es el tejido humano que se emplea con más frecuencia como injerto^{17, 38}.

En la actualidad, se considera que en Estados Unidos existen unos 10, 000 donantes por año a los bancos de huesos²⁸. Por lo que los sistemas sanitarios han desarrollado programas y protocolos de coordinación hospitalaria para organizar las donaciones de órganos y tejidos. Se estima que, en 1996, se practicaron 426,000 injertos óseos en los Estados Unidos. De ellos, 247,000 fueron autoinjertos, 145,000 aloinjertos y en 34,000 casos se emplearon otros materiales (rellenos o injertos óseos). Se considera que el número de injertos óseos por año en el resto del mundo, se puede duplicar. La creación de los bancos de hueso se planteó ante los retos de las cirugías reconstructivas y entre ellas la tumoral. Hoy son más de 80 bancos de huesos reconocidos en nuestro país. En México se cuenta con 406 programas activos de trasplantes de órganos y tejidos distribuidos en instituciones públicas y privadas^{39, 40}

Por otro lado, los injertos óseos desmineralizados y liofilizados promueven una rápida cicatrización de los defectos óseos y poseen la propiedad de inducir una considerable formación ósea, además de no presentar ningún poder antigénico. Estos injertos tienen como desventaja su forma y origen⁴¹. Un gran problema en las reconstrucciones óseas es la dificultad de obtención de hueso humano viable en grandes cantidades, asociado a la prohibición en varios países de la comercialización de órganos o tejidos humanos y la posibilidad de transmisión de enfermedades, así como su alto costo⁴²

En función del tipo de lesión, en los tratamientos se puede utilizar autoinjertos, aloinjertos (cuyo éxito dependerá de la forma de almacenamiento del material del donador, de los problemas de infección y de la reacción inmune) y los xenotransplantes, a los que además se pueden sumar los problemas derivados del rechazo inmune a un tejido de otra especie (figura 1.6)^{20, 42}.

1.6.1. Tipos de injertos

Los injertos óseos se clasifican conforme a su origen:

1.6.1.1. Autoinjertos

La estrategia más usada durante años involucra la toma de un fragmento de hueso del paciente y su posterior trasplante a otra parte de él. Hasta ahora, el injerto autólogo es considerado el material por excelencia y puede ser usado como el estándar de oro con el cual se comparan otros materiales. Las principales características que lo convierten en el tratamiento ideal son sus propiedades osteoconductoras, osteoinductivas y osteogénicas (figura 1.6). Osteoconductoras porque proveen una matriz en la cual las células óseas pueden proliferar; osteoinductivas ya que inducen la proliferación indiferenciada y diferenciada de osteoblastos y osteogénicas ya que las células tienen la capacidad de formar hueso.^{17, 37}. Los autoinjertos presentan buenos porcentajes de éxito y evitan problemas inmunológicos³⁸. La desventaja es que implica una doble cirugía con el riesgo que esto conlleva como son: pérdida de sangre, riesgos de infección, trombosis y fractura del hueso donde se toma el injerto.

1.6.1.2. Aloinjertos

Implican la toma y procesamiento del hueso de un cadáver y de un donador luego su trasplante a un paciente. Este tipo de injerto es acelular y presenta resultados menos positivos ya que su tasa de incorporación es menor debido a la ausencia de células osteoprogenitoras, además de que puede causar una reacción inmune y transmitir enfermedades infecciosas del donante al hospedero tales como VIH, hepatitis C o B (Figura 1.6)³⁷. Los aloinjertos se emplean fundamentalmente para soportar cargas mecánicas y resistir fallos en las zonas donde hace falta soporte estructura³⁷ ya que cuenta con propiedades osteoconductoras. Tienen la ventaja de estar disponibles en cantidades importantes y de ser resistentes.

Existen 2 tipos de aloinjertos óseos:

- Hueso esponjoso. Fundamentalmente se obtiene de donantes vivos (cabeza de fémur en pacientes sometidos a prótesis de cadera), aunque también se puede obtener de cadáveres. Es el tipo de injerto más empleado en múltiples aplicaciones de la cirugía ortopédica.
- Hueso cortical. Se obtiene sólo de donantes cadavéricos, y se emplea fundamentalmente en patologías poco frecuentes (tumores óseos malignos)³⁸.

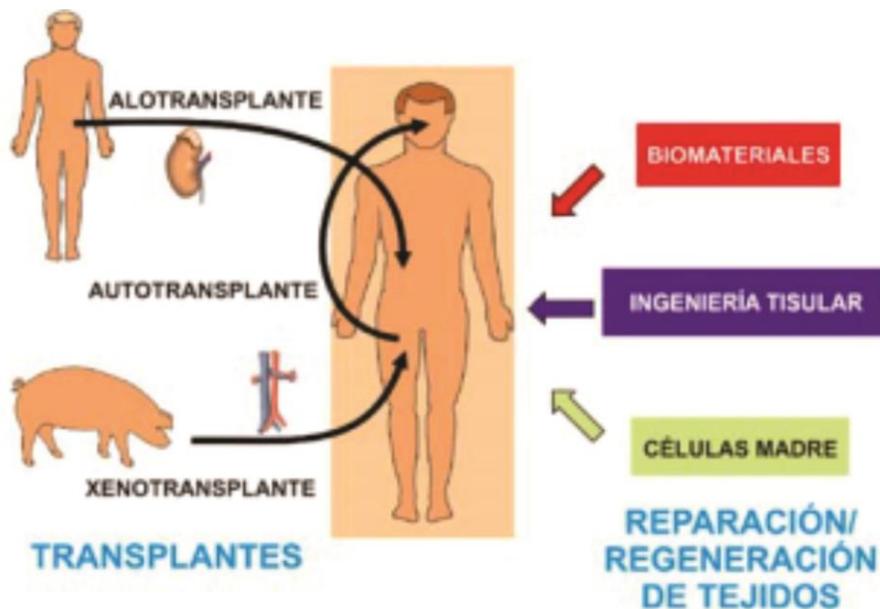


Figura 1. 6 Diferentes aproximaciones para la sustitución de un tejido u órgano dañado²

1.6.1.3. Xenoinjertos

Representan una pequeña porción de las terapias para remplazo óseo y consiste en la utilización de fragmentos de hueso obtenidos de animales o diferentes especies (figura 1.7). Un material que se ha propuesto para la realización de xenoimplantes para tejido óseo es la matriz ósea proveniente del hueso de un animal principalmente bovino⁴¹. Esta matriz está compuesta por cristales de hidroxiapatita (HA) depositados sobre el colágeno tipo I, composición que es igual en todos mamíferos. Un ejemplo de xenoimplante de hueso poroso proveniente del cóndilo del bovino fue investigado en la Universidad Autónoma de México (UNAM) denominado NUKBONE



Figura 1. 7 Hueso inorgánico (xenoinjerto). NUKBONE. ⁴¹

1.6.1.4. Materiales aloplásticos

Estos injertos son inertes, por lo que representan una menor incorporación por parte del lecho receptor. Su utilidad radica en que pueden usarse en pacientes que rechacen un injerto autógeno o de otro humano o animal. Este grupo de materiales aporta propiedades como biocompatibilidad, estabilidad química y bioactividad como la hidroxiapatita, que es el componente fundamental del hueso y los dientes⁴³; por esta razón, los materiales con base en hidroxiapatita no provocan reacción inmunológica apreciable al ser implantados en el lecho receptor¹⁷. Los materiales aloplásticos se dividen en:

Aloplásticos implantables. Hidroxiapatita, silicona, polietileno de alta densidad.

Aloplásticos inyectables. Colágeno, ácido hialurónico, microesferas de hidroxiapatita en gel, poli(metacrilato de metilo).⁴⁴

1.7. Regeneración ósea guiada (ROG)

La ROG, es una técnica muy predecible y efectiva, si se realiza con un buen diagnóstico y un correcto análisis del caso. Su objetivo es favorecer la formación de tejido óseo frente al tejido conectivo y epitelial en el proceso de cicatrización, mientras se les da preferencia a las células osteoblásticas y angiogénicas de la médula ósea adyacente para poblar el área y permitir su crecimiento. Utilizando membranas como barrera en defectos, y al inhibir la migración del epitelio y el tejido conectivo, permite la migración de células óseas derivadas del hueso adyacente, facilitando la formación de hueso nuevo y así regenerar el defecto⁴⁵ (Ver figura 1.8).

Existen dos tipos de membranas:

Reabsorbibles: como las de colágeno, las de ácido poliláctico y poliglicólico o sus copolímeros.

No reabsorbibles: Como las de politetrafluoretileno y PTFE reforzadas con titanio.



Figura 1. 8 Tipos de membrana utilizadas en la Regeneración Ósea

El uso de la ROG después de una quistectomía ha presentado buenos resultados cuando se combina con hueso articulado sobre el defecto óseo y, posteriormente, se cubre con la membrana que forma una matriz sobre la cual las células derivadas de la médula ósea llenan el defecto¹⁷

Otros procesos ocurren a lo largo de la vida del individuo, en sitios y etapas diferentes, como consecuencia del exceso o ausencia de función, que explicarían la reabsorción del hueso del proceso alveolar en zonas desdentadas y la formación en volumen y densidad en zonas vecinas a los implantes⁴⁶. Las estrategias terapéuticas para regenerar el hueso alveolar perdido, con el objetivo posterior a la instalación de implantes, deben tener en cuenta los principios de remodelación ósea. El hueso sano conserva siempre su capacidad de regeneración⁴⁷. Sin embargo existen pérdidas, por procesos traumáticos o infecciosos, que requieren tratamientos de regeneración. En muchos casos, la ventaja de utilizar algún tipo de material para rellenar el defecto es aumentar la superficie donde se produce la respuesta, obteniéndose, luego del proceso de cicatrización ósea, mayor volumen de tejido. El material de relleno genera el soporte funcional y/o estructural para la regeneración de defectos consecuencia de traumas, patologías o cirugía previa³⁹.

1.7.1. Remodelación ósea

El hueso es un tejido dinámico que constantemente se remodela en respuesta al estrés mecánico y cambios hormonales. Durante la infancia y adolescencia, debido a la acción combinada de factores genéticos, hormonales y ambientales, el proceso de formación excede a la resorción, por lo que los huesos crecen tanto en largo como en espesor; aumentando su masa y densidad, llegando hasta una meseta que se alcanza entre los 30 y 40 años de vida. Las fases del remodelado óseo se dividen en las siguientes fases (ver figura 1.9).

Fase quiescente. Se le denomina así al estado de reposo del hueso. En esta fase, cierto número de osteoblastos involucrados en la remodelación pueden ser incorporados en la matriz ósea y diferenciarse a osteocitos, otros quedan sobre la superficie ósea como células de revestimiento y otra parte de ellos mueren por apoptosis

Fase de activación. Fase previa a la resorción, determinada por la presencia de células limitantes que recubren la superficie del hueso. Cuando estas células se retraen, permiten la digestión de la membrana endóstica por acción de las colagenasas, provocando la atracción de los osteoclastos provenientes de los vasos sanguíneos al quedar expuesta la superficie mineralizada.

Fase de resorción. Inicia cuando los osteoclastos se adhieren a la superficie del hueso y comienzan a reabsorber hueso en dos etapas: primero disolviendo la matriz mineral (solubilizándola) y posteriormente digiriendo la matriz osteoide, provocando su descomposición. Esta fase es finalizada por los macrófagos, lo que permite liberar factores de crecimiento

Fase de mineralización. Ocurre a los 30 días del depósito osteoide, finalizando a los 130 días en el hueso cortical y a los 90 para el trabecular. Culminada esta etapa, comienza nuevamente la fase quiescente (Ver figura 1.9)²³.

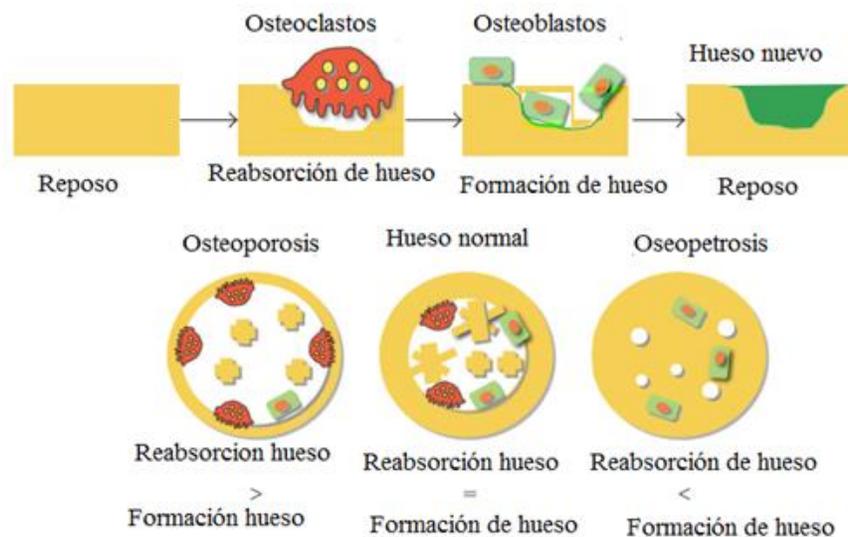


Figura 1. 9 Esquema del ciclo de remodelación hueso y reabsorción del hueso⁴⁶.

1.7.2. Factores reguladores del remodelado óseo

El hueso está sometido a un proceso continuo de renovación que se conoce con el nombre de remodelación ósea (ver figura 1.10). Este proceso se lleva a cabo mediante la destrucción por los osteoclastos de pequeñas unidades microscópicas de tejido, dispersas por el esqueleto, denominadas unidades de remodelación ósea, que son posteriormente sustituidas por tejido nuevo formado por los osteoblastos. El proceso comienza cuando acuden a un determinado foco los precursores de los osteoclastos (fase de activación) que al transformarse en osteoclastos maduros comienzan a resorber hueso (fase de resorción), labrando una cavidad tuberiforme en el hueso cortical (cono de apertura) o lagunar en el trabecular (laguna de Howship), que tras un periodo de aparente inactividad (fase de inversión), será rellenada por el nuevo tejido formado por los osteoblastos. Inicialmente los osteoblastos forman la matriz orgánica (osteóide), que se mineraliza unos 15 días después (fase de formación). Como se comentó anteriormente, el balance entre la resorción y formación está influenciado por una serie de factores interrelacionados entre sí dentro de los que se incluyen los siguientes factores:

Factores Genéticos. Entre 60-80% de la masa ósea se transmite de padres a hijos. Los sujetos de raza negra poseen mayor masa ósea comparada con la raza blanca.

Factores Mecánicos. Se cree que interviene la acción muscular, transmitiendo al hueso tensión a través de los osteocitos, los cuales producen mediadores como prostaglandinas, óxido nítrico y factor de crecimiento análogo a la insulina tipo I (IGF-I), que estimulan tanto su actividad como a la de los osteoblastos y origina una mayor formación ósea.

Factores vasculo nerviosos. Los vasos sanguíneos se constituyen como el primer paso para la osificación. En el caso de la inervación, se le ha implicado en la fisiología ósea debido a la osteopenia y la fragilidad ósea que se encuentran presentes en pacientes con desórdenes neurológicos.

Factores nutricionales. Este factor puede ser modificado, el requerimiento diario mínimo necesario recomendado de calcio para la mineralización es de 1,200 mg diarios hasta los 25 años de la vida, no menor a un gramo hasta los 45 y a partir de la menopausia de 1,500 mg.

Factores hormonales. Se consideran muy importantes en el desarrollo normal del esqueleto. Entre éstos se incluyen hormonas tiroideas, parahormona, calcitonina, dihidroxicolecalciferol ($1,25(\text{OH})_2$) también llamado calcitriol, andrógenos, estrógenos, progesterona, insulina, glucocorticoides, hormona del crecimiento y leptina.

Factores locales. Se incluyen los siguientes factores de crecimiento: factores de crecimiento análogos a la insulina tipo I y II (IGF-I e IGF-II), factores de crecimiento transformante beta ($\text{TGF-}\beta$), proteínas morfogenéticas óseas (BMP), factor derivado de las plaquetas (PDGF), factor fibroblasto, factor epidérmico, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, factor de necrosis tumoral (NTGF); citoquinas (interleucina y prostaglandinas) y proteínas de la matriz ósea^{23, 46}

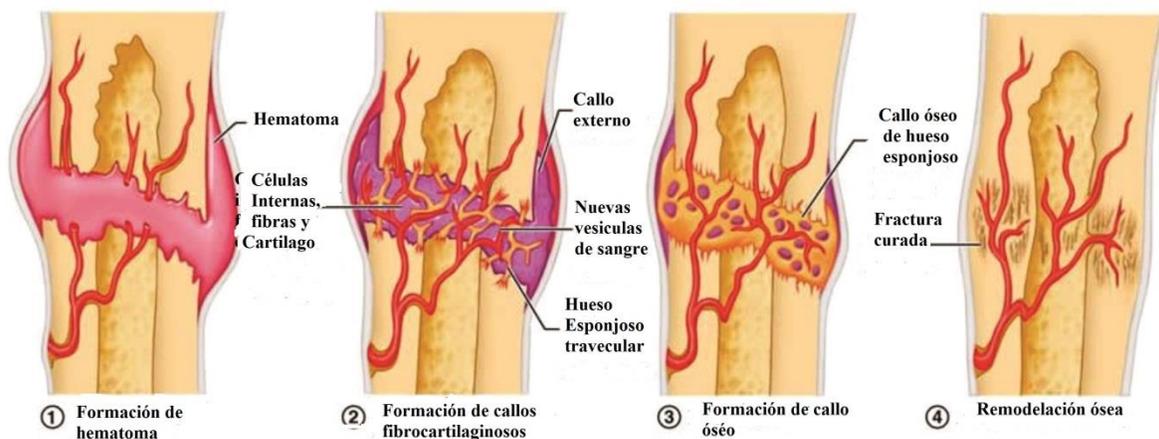


Figura 1. 10 Factores reguladores de remodelación ósea⁴⁸

1.8. Ingeniería de Tejidos

La ingeniería de tejidos ha tenido éxito en la generación de injertos permanentes y/o parciales y en quemaduras. Por lo tanto la Ingeniería de Tejidos se puede definir como un área científica interdisciplinar que, para reparar, reemplazar, mantener o mejorar la función particular de un órgano o tejido, donde se crea un entorno extracelular en el que se incorporan células (Figura1-11). Existen tres elementos importantes que se requieren para la ingeniería de tejidos, células, andamios y factores de crecimiento^{37, 49}.

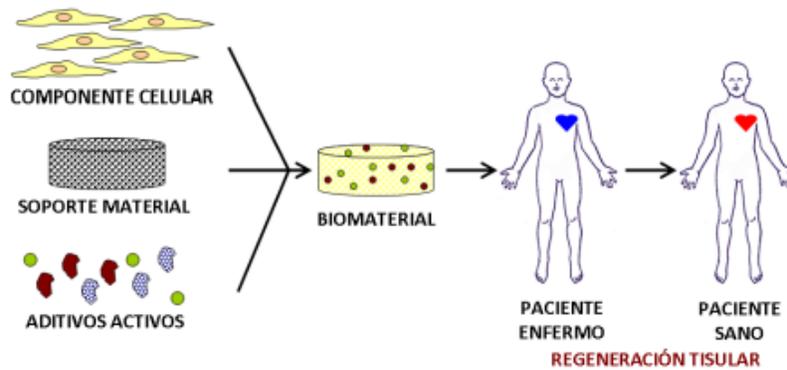


Figura 1. 11 Esquema simplificado del concepto de Ingeniería de Tejidos.^{21, 50}

Uno de los métodos más utilizados en la Ingeniería de Tejido óseo comprende el cultivo de células en matrices tridimensionales biodegradables altamente porosas, tratadas con moléculas de señalización, que después de ser implantadas sobre el defecto se espera que dirijan el crecimiento del nuevo tejido. Las células adheridas a la matriz deben proliferar, diferenciarse y organizarse en un tejido normal, mientras que la matriz según el material utilizado, se metaboliza o degrada. Aunque con esta estrategia se han obtenido buenos resultados, también se encuentran variaciones, dependiendo de la necesidad; por ejemplo, la inyección directa de células o de moléculas de señalización en el sitio del defecto cuando el tejido dañado está confinado a una pequeña región. La Ingeniería de Tejidos se enfrenta a grandes desafíos, que de ser superados, le permitirán posicionarse como la opción más viable para reparar, mantener y sustituir tejidos dañados⁴⁹.

Los avances más significativos en la ingeniería de tejidos óseos se han logrado a través de la mejora de alguno de los elementos de la ingeniería tisular; por ejemplo, diseño de los materiales, diseño del reactor o fuente de las células, pero sin apartarlo del enfoque general, es decir, tomando en cuenta la interrelación entre sus componentes. Los osteoblastos, condrocitos y células madres mesenquimales obtenidas a partir de tejidos duros y blandos se pueden expandir en cultivo sembrando sobre andamios que poco a poco se degradan y se reabsorben como estructuras de los tejidos que crecen *in vitro* y/o *in vivo*. Los andamios proporcionan el apoyo necesario para la proliferación de las células y para mantener la función, la arquitectura y la forma final en el hueso nuevo. Varios andamios han sido

investigados para la ingeniería de tejido óseo tales como los poli (α - hidroxí ésteres) y polímeros naturales como el colágeno y quitina así como los polímeros biodegradables y bioabsorbibles⁵¹.

Por otra parte, los poliuretanos biodegradables elastoméricos han sido usados para ayudar a la reparación y reconstrucción de tejidos como el óseo. En la (figura 1.12) se muestra el andamio que en ingeniería de tejido óseo juega un papel clave ya que proporciona la arquitectura temporal para el proceso de reparación. Por lo tanto, polímeros biodegradables tanto de origen natural y sintéticos que son citocompatible permiten la proliferación de células.⁵²

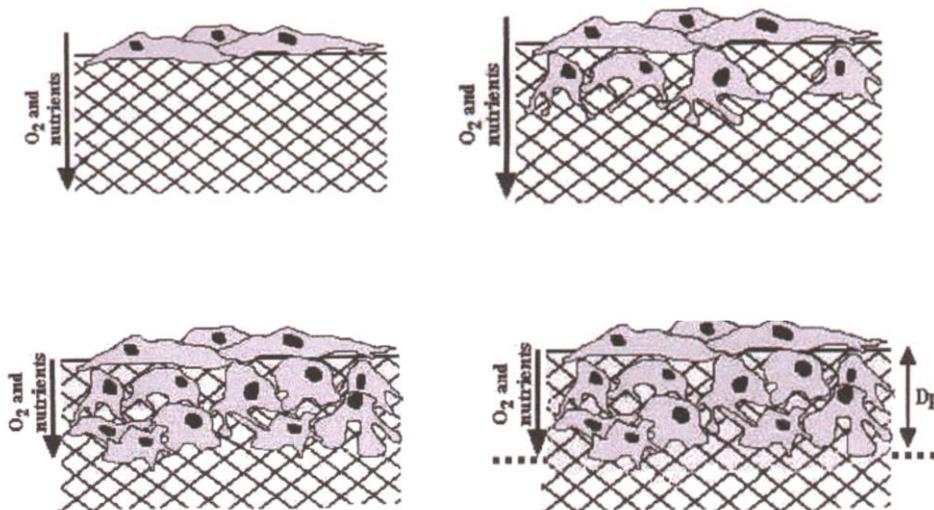


Figura 1. 12 Modelo de migración celular en andamios⁵³

A continuación, se hace un breve resumen acerca de la composición y reacciones químicas de los poliuretanos, ya que esta información es útil para en diseño de materiales que sean adecuados para estas aplicaciones.

1.9. Polímeros

Los materiales poliméricos sintéticos han sido ampliamente usados en dispositivos médicos como, materiales para prótesis, materiales dentales, implantes, polímeros para liberación controlada de fármacos, tejidos, encapsulantes, etc. Las principales ventajas de los polímeros, comparados con los metales y los cerámicos, es su facilidad para producirse, fácil

procesamiento, precio moderado, disponibilidad, y adaptación tanto de sus propiedades mecánicas, físicas y/o químicas dependiendo de las necesidades.

Los polímeros usados como biomateriales deben cumplir con ciertas características que se enlistan a continuación:

Biocompatibilidad, es decir, debe ser aceptado por el organismo sin provocar que éste sea rechazado ante la presencia del biomaterial. No debe ser cancerígeno, ni tóxicos, y anti alérgicos.

Fácil esterilización

Esterilización por calor seco: La esterilización a 125°C por 6 h. no tiene efecto significativo sobre las propiedades mecánicas de los poliuretanos. En materiales porosos la esterilización por calor seco puede causar deformación en la estructura de los poros y disminución del tamaño de poros.

Método de autoclave de vapor y agua húmedo: El vapor de la autoclave a (125°C 1.5 h) y esterilización con agua hirviendo, no es recomendable para los poliuretanos debido a la hidrólisis del polímero.

Método de óxido de Etileno (ETO): La esterilización se lleva a cabo entre 21°C – 66°C y una humedad relativa entre 30% a 60%. La concentración del gas está en un intervalo de 400 -1600 mg/L. El óxido de etileno se usa en forma directa. El proceso de esterilización depende del tiempo con respecto al tamaño del esterilizador, masa y densidad del material. La desventaja del ETO es que puede causar irritación en la piel y mucosa de las membranas, también puede causar quemadura en los tejidos debido a su reacción con las proteínas por ser un agente alquilante. En los polímeros puede afectar el tamaño de los poros y estructura. Sin embargo los poliuretanos pueden ser esterilizados con óxido de etileno a bajas temperaturas y humedad.

Esterilización por Radiación (Gamma y Beta): La esterilización con radiación requiere de dosis entre 1.5-2.5 Mrad o arriba de 6 Mrad puede ser necesario para eliminar microorganismos. Los poliuretanos pueden ser esterilizados con radiación con cambios

significativos en las propiedades físicas; sin embargo, incrementa ligeramente el esfuerzo a tensión y la elongación no es afectada; múltiples esterilizaciones pueden causar entrecruzamiento y/o degradación en los polímeros.

Gamma (^{60}Co). Esta esterilización es caracterizada por su alta eficiencia, penetración alta, y profundidad; requiere tiempos de exposición largos y puede provocar daños al material.

Beta. Esta esterilización tiene alta energía de electrones, es eficiente y es corto el tiempo de exposición, sin embargo puede provocar daños al material.

Otros factores

Por otra parte, el implante no debe causar molestias o dolor, sangrado excesivo, respuesta a cuerpo extraño, deformidad o transmisión de enfermedades. No debe reabsorberse antes de la formación de hueso nuevo, ya que puede provocar formación de cavidades y/o inducir tensiones indeseables. Además, debe ser químicamente estable (no presentar degradación en el tiempo) e inerte sobre todo en aplicaciones a largo plazo (permanentes).

En aplicaciones óseas, debe ser osteoactivo, es decir, debe estimular la formación de nuevo hueso. La osteoactividad se manifiesta en el carácter osteoinductor y/o osteoconductor del implante⁵⁴.

1.9.1. Polímeros biodegradables

El uso de polímeros biodegradables como materiales de implante es beneficioso ya que los implantes pueden ser degradados, y se absorben y eliminan por el cuerpo una vez que su objetivo es completado, sin dejar material extraño en el cuerpo. Por ejemplo, PGA es convertido en metabolitos o eliminados por otros mecanismos, mientras que PLA puede entrar al ciclo de ácidos tricarboxílicos⁵⁵. Los poliésteres son más atractivos para muchas aplicaciones biomédicas ya que estos polímeros, en su mayoría, sufren degradación en masa por hidrólisis del enlace éster aunque estos polímeros pueden también, posiblemente, ser degradados enzimáticamente. La degradación *in vivo* de los poliuretanos procede

principalmente de la escisión hidrolítica de la cadena en grupos éster y uretano, mientras que las reacciones oxidativas siempre tienen lugar en los segmentos de poliéter. Además, la degradación puede ser acelerada por la acción de enzimas celulares, peróxidos,⁵⁶ catálisis por iones metálicos y grupos carboxílicos formados, calcificación y acción de esfuerzos repetitivos sobre los implantes

En general la degradación decrece en el siguiente orden:

PGA > PDLLA > PLLA > PCL⁵⁷

Como en los sistemas biodegradables es difícil tener adhesión y proliferación celular es necesario cuidar varios aspectos en la síntesis, por ejemplo: los reactivos, tratamientos necesarios para producir, materiales, lo más compatibles y bio funcionales posibles.

La degradación de PLA, PGA y los copolímeros PLA/PGA implica generalmente hidrólisis del enlace éster. PLA se degrada en ácido láctico que normalmente se presenta en el cuerpo (Ver tabla 1.2). En el caso de PGA se rompen por la presencia de la enzima esterasa y es excretado por medio de la orina. La PCL es considerada no tóxica y compatible con el tejido, su degradación es de aproximadamente de 3 años *in vitro*. La rapidez de degradación están determinados por factores tales como: estructura configuracional, cristalinidad, peso molecular, morfología, esfuerzo, cantidad de monómero residual, porosidad y el sitio de implantación.⁵⁸

Tabla 1. 2 Poliésteres Biodegradables⁴²

POLIMERO	UNIDAD REPETITIVA DEL POLIMERO
Poli (ácido glicólico)	$\left[\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_n$
Poli (ácido láctico)	$\left[\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_n$
Poli (glicólico-láctico)	$\left[\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_n$
Poli (dioxanona)	$\left[\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_n$
Poli (caprolactona)	$\left[\text{O}-(\text{CH}_2)_5-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_n$
Poli (3 hidroxibutirato)	$\left[\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_n$
Poli (3 hidroxivalerato)	$\left[\text{O}-\underset{\text{C}_2\text{H}_5}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_n$
Poli (valerolactona)	$\left[\text{O}-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_n$

Poli (β -ácido malónico)	$\left[\text{O}-\underset{\text{COOH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_n$
---------------------------------	---

1.9.2. Degradación en polímeros

Se entiende por degradación de un polímero a los cambios significativos que experimenta su estructura química por pérdida de uno o más átomos de carbono en una cadena abierta o en un ciclo) bajo la acción de determinadas condiciones (medios ambientales), resultando en la pérdida de propiedades del material. Por lo tanto, un requisito indispensable para que los materiales poliméricos sea degradables es que tengan grupos en la cadena principal que se puedan romper fácilmente por la acción de agentes externos de naturaleza física o química. Las reacciones que tienen lugar pueden ser oxidativas, enzimáticas o hidrolíticas y generalmente conducen a una pérdida de masa en el material. Los cambios físicos consisten en la decoloración, pérdida del brillo superficial, formación de grietas, erosión superficial y pérdida como la resistencia a la tracción y alargamiento. Los cambios químicos consisten en la ruptura de cadenas, cambios en los sustituyentes laterales, y reacciones de entrecruzamiento⁵⁹. Sin embargo, el mayor problema ha sido la toxicidad de los productos de degradación, por ejemplo, los productos de degradación de poliuretanos basados en diisocianato como MDI y TDI son tóxicos⁵⁸.

1.9.2.1. Degradación térmica

Es el proceso en el que el polímero se degrada de forma directa por efecto del calor. Este proceso está acompañado por la ruptura homolítica o no de los enlaces covalentes de la cadena o de los grupos laterales como consecuencia del aumento de temperatura. Dependiendo de la reactividad de cada radical se producirán unas reacciones u otras, en este caso, los hidroperóxidos están térmicamente adheridos a los radicales reactivos de la degradación térmica⁶⁰

1.9.2.2. Degradación hidrolítica

El concepto de la degradación de un polímero se asocia a la disminución de la masa molecular, por tal motivo, es necesario que la cadena principal se rompa en diferentes puntos. Por lo tanto, ésta degradación implica la hidrólisis de los grupos funcionales que se encuentren presentes en la cadena principal. La degradación hidrolítica se produce por el contacto del material con un medio acuoso. La penetración del agua dentro de la matriz provoca el hinchamiento, ruptura de puentes de hidrogeno intermoleculares, hidratación de las moléculas y finalmente la hidrólisis de los enlaces inestables. La ruptura de los grupos funcionales por hidrólisis, puede suceder tanto en los grupos situados en la cadena principal como en los sustituyentes laterales.⁶¹

1.9.2.3. Biodegradación

La biodegradación hace referencia a la transformación y deterioro que se producen el polímero debido a la acción de enzimas y/o microorganismos. La biodegradación puede ser parcial o total. La biodegradación parcial es la alteración de la estructura química del polímero y pérdida de propiedades específicas.⁶² En tanto que en la degradación total, el polímero es degradado totalmente por la acción de microorganismos con la producción de CO₂ bajo condiciones aeróbicas y metano bajo condiciones anaeróbicas (sales, agua, minerales y biomasa)⁶³. Los polímeros biodegradables comúnmente son degradados con agua, y tienen baja cristalinidad o tienen bajos puntos de fusión. El proceso de degradación pueden ser por hidrolisis o fotolisis⁶⁴. Existen dos tipos de polímeros biodegradables, los polímeros naturales que incluye a los polisacáridos o proteínas como el colágeno, fibrinas. La segunda categoría pertenece a los polímeros biodegradables sintéticos que pueden ser producidos bajo condiciones controladas, por lo tanto presentan propiedades físicas y químicas reproducibles tal como resistencia a la tensión, módulo elástico y tasa de degradación; su desventaja radica en el control de impurezas en el material.⁵⁵. Los poliuretanos segmentados y poliuretano urea han captado la atención no solo para el desarrollo de polímeros biodegradables sino también porque tienen gran potencial en su estructura y presentan propiedades mecánicas y velocidad de degradación ajustables para varias aplicaciones médicas.⁶⁵. El uso de poliuretanos biodegradables pueden ser una

alternativa para reemplazar polímeros no degradables tales como el propileno y polietileno en la fabricación de películas y que en un futuro pudieran contribuir a problemas ambientales. La biodegradabilidad de los poliuretanos depende de la estructura química y especialmente en enlaces éster hidrolizables en la cadena principal, el cual también es susceptible al ataque microbiano, y otros y otros factores tales como peso molecular, grado de cristalinidad y morfología.⁶⁶ (Ver figura 1.13).

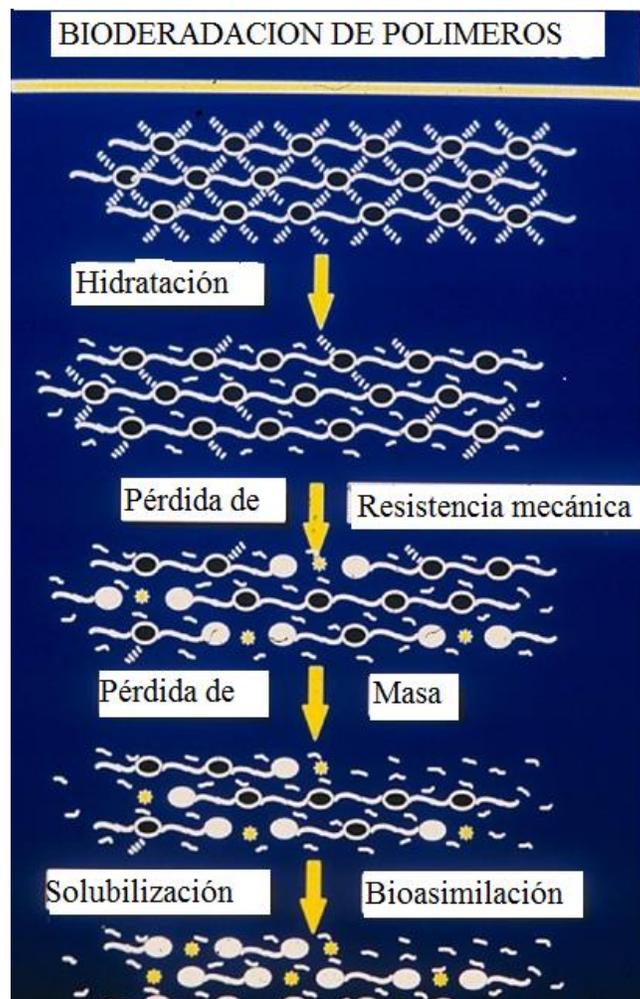


Figura 1. 13 Proceso de biodegradación de polímeros⁶⁷

1.9.3. Poliuretanos (PU)

El nombre genérico de los poliuretanos se refiere a los polímeros que tienen un grupo uretano

($-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-$) ligado en la cadena, aunque los grupos uretanos constituyen una fracción del número total de ligaduras en la cadena polimérica. Los uretanos lineales pueden producirse por condensación y adición reacción de diisocianato con un poliol (ver figura 1.14).

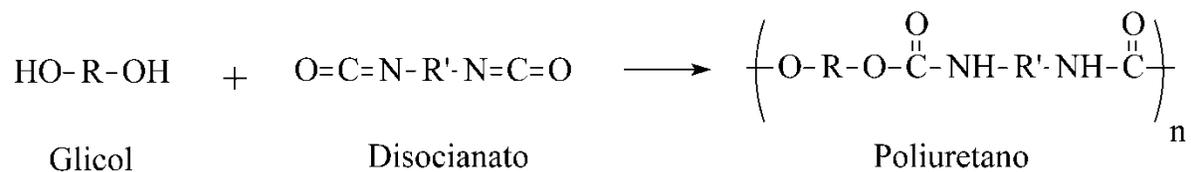


Figura 1. 14 Reacción básica para la síntesis de un poliuretano⁶⁸

Los poliuretanos son empleados en numerosas aplicaciones biomédicas tanto por sus excelentes propiedades mecánicas como por su buena biocompatibilidad⁶⁹. Los poliuretanos tienen un historial comprobado como biomateriales ya que pueden ser diseñados para mejorar el crecimiento y proliferación celular⁷⁰. Además, las propiedades mecánicas de los poliuretanos se pueden adaptar para su uso como biomateriales sustitutivos de tejidos duros o blandos.⁷¹ Los poliuretanos son usados en la fabricación biomédica de regeneración de hueso, aisladores para cables de estimulación cardíaca, catéteres, diafragmas de sangre, materiales ortopédicos, implantes, recubrimiento de implantes y adhesivos tisulares entre otros.^{72, 73} Los poliuretanos elastoméricos biodegradables pueden ser diseñados para nuevas aplicaciones que requieran flexibilidad y elasticidad en ingeniería de tejidos.⁷²

Los homopolímeros lineales de uretano son materiales rígidos, altamente cristalinos, con propiedades físicas similares a las de las poliamidas alifáticas. La temperatura de fusión decrece al incrementar el número de grupos metilenos entre el grupo diisocianato (NCO) de los grupos (OH) usando dioles en la síntesis de poliuretanos.⁵⁷

Se funden a temperaturas en el intervalo de 140°C a 176°C. Para series homólogas de polímeros, las temperaturas de fusión son más altas para los polímeros con un número par de

grupos metileno. Los homopolímeros lineales de uretano cristalizan en una conformación en zig-zag. La cristalización de la masa fundida produce cristales en forma de aguja y esferulitas.⁵⁷

Los poliuretanos se producen por poli adición de un diisocianato un polioliol di funcional en presencia de otros reactivos tales como catalizadores, extensores de cadena, surfactantes, cargas, pigmentos etc.⁷³ El polioliol constituye el segmento flexible o suave, mientras que el diisocianato y extensor forman el segmento rígido o duro.⁷³

Los polioliolos que comúnmente se usan para la obtención de poliuretanos incluyen a distintos dioles como los poliésteres terminados en hidroxilos tales como la policaprolactona diol, o el poli(oxitetrametileno) glicol, o el polibutadieno terminado en hidroxilo⁷⁴. Los diisocianatos pueden ser aromáticos o alifáticos y ser modificados con compuestos hidroxilados que varían en funcionalidad, en peso y en naturaleza molecular.⁷¹ La reactividad del grupo diisocianato se debe a que existe una estructura electrónica de resonancia donde la densidad de electrones es menor en el carbono, intermedia en el nitrógeno y mayor en el oxígeno.⁵⁷ Así, un centro nucleofílico puede atacar al carbono electrofílico unido al nitrógeno. Grupos aceptores de electrones ligados al NCO aumentan la reactividad, por lo que los diisocianatos aromáticos son más reactivos que los alifáticos, aunque conviene señalar que también se debe tomar en cuenta el impedimento estérico.⁷³

Al mezclarse el diisocianato y el polioliol experimentan una serie de reacciones que conducen a la producción de uretano (ver figura 1.15), mientras que al reaccionar una amina con diisocianato se producen ureas. La estabilidad térmica de los uretanos depende de la naturaleza del polioliol, del extensor de cadena y tipo de diisocianato.⁷⁵ El diisocianato que se elija para la elaboración de un poliuretano dependerá de tres aspectos importantes: rapidez de reacción (reactividad), la rigidez deseada del polímero y los productos de descomposición del mismo⁷³. En general, los diisocianatos aromáticos son más reactivos que los alifáticos; reacciona vigorosamente con compuestos que contienen hidrógenos activos, como el polioliol el cual contiene grupos hidroxilo y el extensor de cadena el cual es una molécula pequeña que puede contener grupos amino, hidroxilo y/o ácidos carboxílicos⁵⁷

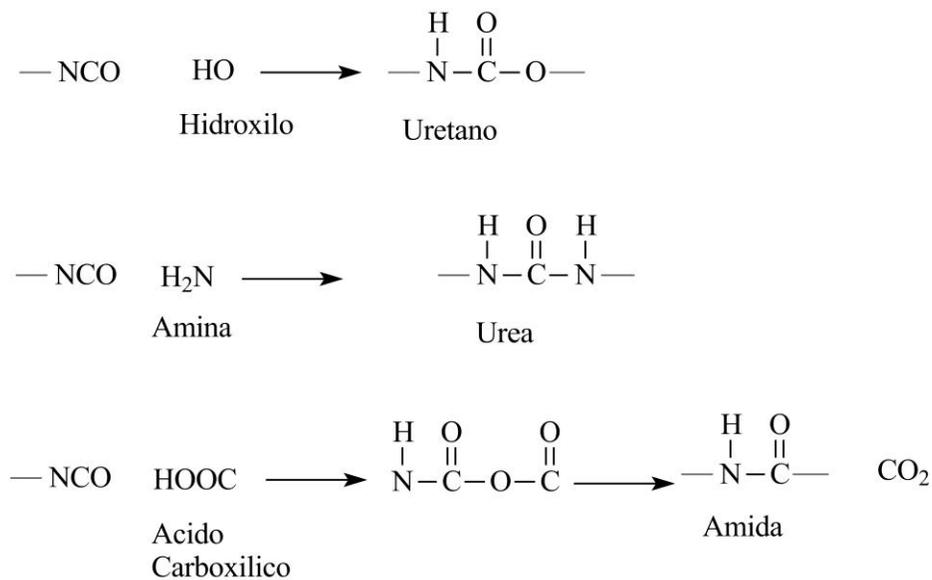


Figura 1. 15 Reacciones principales de los poliuretanos segmentados para aplicaciones médicas⁵⁷

1.9.3.1. Poliuretanos Segmentados

Los compuestos más utilizados desde el punto de vista biomédico son los denominados poliuretanos segmentados (SPU por sus siglas en inglés), en cuyas formulaciones se combinan secuencias monoméricas de estructuras rígidas con estructuras blandas o flexible.⁷² La incompatibilidad química de ambos tipos de secuencias origina una segregación de fases con la aparición de dominios que pueden ser amorfos o semicristalinos, los poliuretanos segmentados actúan como puntos de entrecruzamiento físico dotando de gran flexibilidad y tenacidad al sistema^{65, 76}

Para obtener poliuretano segmentado (SPU's), primero se sintetiza un pre polímero mediante un exceso de diisocianato con un polioliol; seguidamente se hacen reaccionar los grupos diisocianato terminales del pre polímero con un extensor de cadena que puede ser un diol de bajo peso molecular para formar poliuretanos segmentados (SPU's) propiamente dichos o, una di amina para formar poliuretano ureas (SPUUs), dando lugar a la cadena macromolecular final. Sin embargo, también hay reacciones colaterales importantes durante la síntesis de poliuretanos como se muestran en la (figura 1.16)⁵⁷. Comparado con otros biomateriales los poliuretanos segmentados poseen muchas ventajas tal como: tenacidad, dureza, resistencia al agua, resistencia química y excelente propiedades mecánicas, buena

biocompatibilidad en una gran variedad de aplicaciones. Estos materiales son usados en el campo biomédico tales como suturas, sistema controlada de fármacos, implantes par cirugía de ortopedia e ingeniería de tejidos, aplicaciones vasculares, válvulas cardiacas, reconstrucción ligamentos, reemplazos de meniscos y regeneración ósea^{65, 77}. Uno de los problemas con los poliuretanos para ser usado como un dispositivo y/o sustituto es la inestabilidad molecular en el ambiente biológicamente activo, lo que depende la estructura química o del material.^{73, 78}.

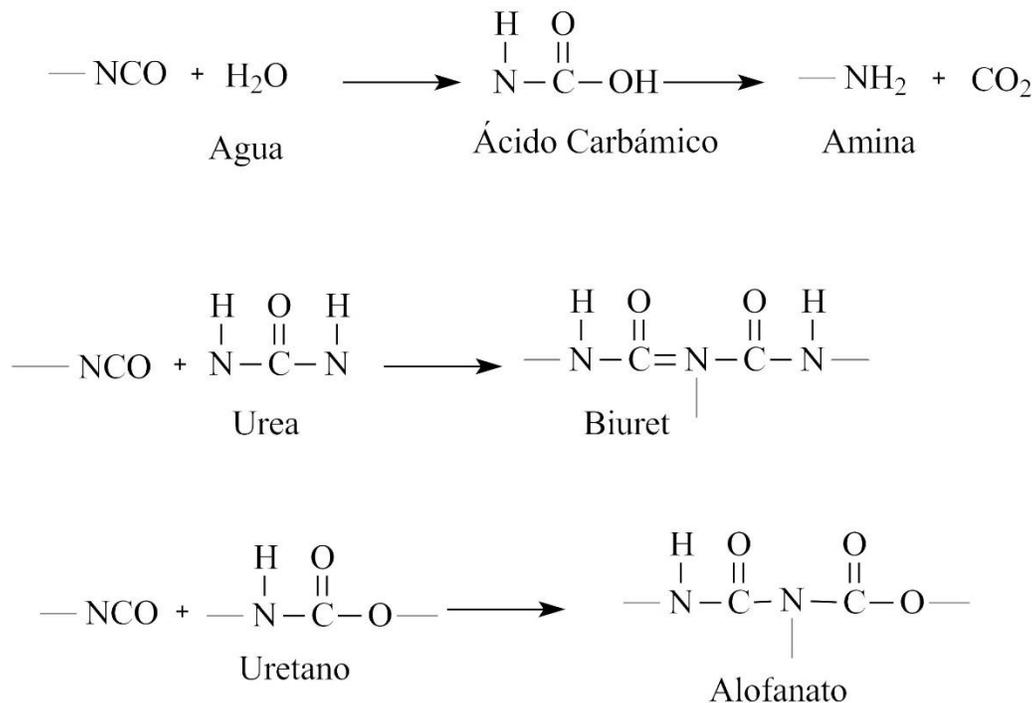


Figura 1. 16 Reacciones colaterales durante la síntesis de poliuretanos⁵⁷

Una característica peculiar de los SPU's es la existencia de dos segmentos distintos en su estructura: uno rígido, que contiene todas las estructuras relacionadas con el diisocianato y el diol (o di amina), y el otro flexible, que contiene todas las estructuras relacionadas con el polioli. El segmento rígido, tiende a producir una estructura resistente y el segmento suave, confiere flexibilidad y elasticidad al material.⁷⁴

Considerando la proporción relativa de cada tipo de segmento, la estructura macromolecular de los SPU's puede ser esquematizada como dominios o fases de segmentos rígidos

parcialmente organizados y dispersados en una matriz de segmentos flexibles (figura 1.17). A temperatura ambiente los segmentos flexibles están en estado huloso, mientras los segmentos rígidos están en su estado vítreo, manteniendo las propiedades mecánicas del material.⁶⁵

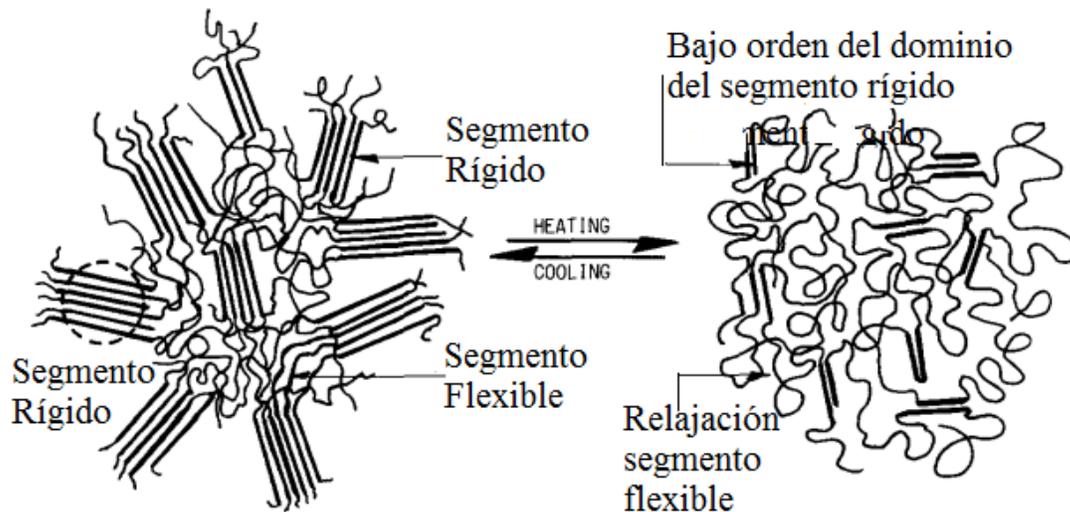


Figura 1. 17 Modelos morfológicos de mezcla de fases: segmento flexible y segmento rígido⁵⁷

Factores químicos tales como la composición, peso molecular del segmento flexible, longitud del segmento rígido y, factores físicos tales como el método de fabricación, son usados para modificar la estructura y morfología de toda la masa del polímero o su superficie. Los dominios del segmento duro juegan un papel importante en el rol en el comportamiento mecánico o del material, en funciones como entrecruzamientos físicos y/o fibras gomosas de la matriz del segmento flexible, que incrementa el módulo elástico.⁶⁵

Estos factores hacen a los SPU's materiales muy versátiles y determinan su desempeño en aplicaciones biomédicas.

1.9.3.2. Segmento flexible

Convencionalmente polioles son usualmente poliéter (con repeticiones de estructuras –R-O-R'-) o poliéster (repetiendo la estructura R-COO-R'-) con cadenas finales terminados por

grupos hidroxilos. A diferencia de los diisocianatos y extensores de cadena, el polioli es oligomérico con peso molecular que van de unos pocos cientos a unos cuantos miles. A temperatura ambiente, los polioles pueden ser líquidos o sólidos (similar a la cera), dependiendo del peso molecular.⁷⁹ Debido a su estructura alifática y baja interacción intermolecular, las moléculas de polioli giran y se doblan fácilmente y son, por lo tanto, materiales blandos (Tabla 1.3). Por consiguiente, la secuencia de polioli en poliuretanos segmentados se conoce como el segmento flexible (también llamados suave o blando)⁸⁰.

Tabla 1. 3 Polioles como segmentos flexibles.⁵⁷

POLIOLES	
Formulas	Nombre del polioli
$\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n\text{H}$	Oxido de polietileno (PEO)
$\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_n\text{H}$	Oxido de politetrametileno (PTMO)
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}-\text{O})_n\text{H} \end{array}$	Oxido de propileno (PPO)
$\text{HO}-(\text{C}-(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2)_n-\text{OH}$	Poliisopropileno (PIB)
$\text{HO}-(\text{C}-(\text{CH}_2)_4-\text{O}-\text{OC}(\text{CH}_2)\text{CO}-\text{O})_n\text{H}$	Adipato polietileno (PEA)
$\text{HO}-[(\text{CH}_2)_5-\text{CO}-\text{O}]_n\text{H}$	Policaprolactona (PCL)
$\text{HO}-(\text{CH}_2)_4-[\text{Si}(\text{CH}_3)_2-\text{O}]_x-\text{Si}(\text{CH}_3)_2-(\text{CH}_2)_4-\text{OH}$	Polidimetil siloxano, terminado hidroxibutil (PDMS)-OH
$\begin{array}{c} \text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{CH}=\text{CH}_2 \end{array}$	Polibutadieno (PBD)

La poli(ϵ -caprolactona), conocida por ser biocompatible, ligeramente hidrolítica y enzimáticamente biodegradable, es usada comúnmente como segmento flexible en los poliuretanos segmentados biodegradables ^{81, 82}. La poli(ϵ -caprolactona), es un poliéster alifático utilizado por su susceptibilidad a la hidrólisis. Debido a su semicristalinidad natural

y la hidrofobicidad, la degradación de la PCL es notablemente lenta (años). Debido al empaquetamiento de la matriz macromolecular (cristalinidad), los fluidos (buffer, agua) tardan en ingresar en el interior del polímero. Por lo tanto este material está desarrollado para implantes de largo plazo.⁵⁴

La poli(ϵ -caprolactona) tiene excelentes propiedades mecánicas y buena solubilidad^{83,72}. También se ha usado como una matriz para ingeniería de tejidos y en un número variado de dispositivos médicos y de liberación controlada de fármacos con la aprobación de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos de América. La biodegradabilidad y no toxicidad de la poli(ϵ -caprolactona) es de gran interés para la liberación controlada de fármacos sobre todo en dispositivos poliméricos implantados sub dérmicamente^{61, 84}

La PCL tiene una temperatura de transición vítrea de alrededor de -60°C , una baja temperatura de fusión (de 59°C a 64°C), se descompone térmicamente a 350°C y es compatible con otros polímeros^{85,86}. La PCL puede obtenerse mediante la polimerización por apertura de anillo de la ϵ -caprolactona, usando un catalizador como el octanoato de estaño, el cual ha sido aprobado por la FDA^{85, 87}. La presencia de cinco grupos metileno no polares en la unidad repetitiva de la PCL proporciona propiedades únicas que son similares a las poli olefinas y lo convierte hidrofóbico, mientras que la presencia de enlaces éster, hidrolíticamente inestables, ocasiona que el polímero sea biodegradable^{86,87} (figura 1.18). La combinación de su cristalinidad y carácter olefínico determinan su baja tasa de biodegradación. Por otro lado, al incrementar el peso molecular de la PCL, se incrementa la cristalinidad de los segmentos flexibles⁵⁸

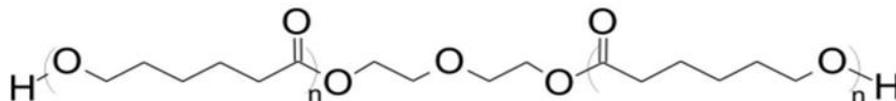


Figura 1. 18 Estructura de la PCL diol

Entre las propiedades superficiales de la PCL se sabe que es hidrofóbico, con pobre adhesión y proliferación celular.⁸⁸ Por otra parte la PCL se degrada, tanto en masa como por erosión

de la superficie, siendo el ácido 5-hidroxi hexanoico (ácido caproico) el producto de su degradación. Este producto de la degradación de la PCL pueden ser metabolizado a través del ciclo de Krebs o eliminado directamente por secreción renal y, por esta razón, la PCL es reconocida como no tóxica y compatible con tejidos^{89,58}

1.9.3.3. Segmento rígido.

1.9.3.3.1. Isocianatos

El isocianato más importante usado en la síntesis de poliuretanos es un isocianato que contiene dos grupos diisocianatos por molécula. Estos dos grupos funcionales trabajan para unir (por reacción química) otras dos moléculas (poliol o extensor de cadena) para formar una cadena lineal. El diisocianato puede ser aromático o alifático, como representado por 4,4'-difenil metano diisocianato (MDI) y MDI hidrogenado (HMDI). Otro compuesto de diisocianato igualmente importante (o incluso más importante en la industria) es el tolueno diisocianato, o TDI, que también es de naturaleza aromática⁹⁰. Las estructuras químicas de estos tres tipos de compuestos de diisocianato se muestran en la Tabla 1.4. Debido a la estructura de anillo de los diisocianatos y la fuerte interacción intermolecular tales como enlaces de hidrógeno entre los grupos uretano que forman después de la reacción de diisocianato con extensor de cadena, los segmentos que contienen diisocianato y el extensor de cadena son más rígidos que el poliol, son típicamente vítreos a temperatura ambiente y por lo tanto se denominan segmentos duros.⁸⁰

Los diisocianatos reaccionan vigorosamente con aminas, ácidos carboxílicos y alcoholes; debido a esta alta reactividad, los segmentos rígidos de los poliuretanos han sido modificados para hacerlos biodegradables⁹¹. Por ejemplo, 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 di amina no tóxica que entre otras funciones es esencial para el crecimiento y diferenciación celular.⁹²

Tabla 1. 4 Diisocianatos típicos usados en la síntesis de poliuretanos elastoméricos^{80, 93}

		Diisocianato	
		Nombre del diisocianato	Formulas
Aromáticos	4,4-difenilmetano diisocianato (MDI)		
	2,6 y 2,4 tolueno diisocianato (TDI)		
Alifáticos	4,4'-dicyclohexilmetano diisocianato (HMDI)		
	Trans 1,4-ciclohexano diisocianato (HDI)		
	Isoforona diisocianato (IPDI)		
	Hexametileno diisocianato (HDI)		$OCN-(CH_2)_6-NCO$
	1,1,6,6-tetrafluorohexametileno diisocianato		$OCN-CH_2(CF_2)_4CH_2-NCO$

Los poliuretanos elastómericos basados en diisocianatos alifáticos presentan una estabilidad que pudiera resistir a la hidrólisis y la degradación térmica. El grupo diisocianato ($-N=C=O$), es en general muy activo debido a sus dos dobles enlaces contiguos; sin embargo, dependen de su ubicación (grupo primario o secundario), del impedimento estérico y del grado de sustitución del diisocianato^{68, 75}. Estos efectos pueden ser controlados con el uso adecuado de catalizadores. Los diisocianatos alifáticos son menos reactivos que los aromáticos y su reactividad se presenta de la siguiente manera;

MDI: CHDI: IPDI: HMDI

1.0 0.28 0.15 0.13

Los diisocianatos aromáticos y alifáticos entran a una serie de reacciones con ellos mismos y/o grupos químicos que contienen hidrogeno activado. Los diisocianatos aromáticos son fáciles de dimerizar a bajas temperaturas, especialmente en presencia de ácidos o bases.^{93, 94} Debido a estas propiedades, los grupos del isocianato tienden a organizarse para formar fases semicristalinas dentro de polímero. Cada tipo de diisocianato tiene la capacidad intrínseca para formar diferentes estructuras de micro fase. La elasticidad de los polímeros depende de su grado de elasticidad y del grado de segregación del segmento.^{75, 95, 96}

1.9.3.3.1.1. Extensores de cadena

Las propiedades de los poliuretanos pueden mejorarse al adicionar un extendedor de cadena. El funcionamiento de un extendedor de cadena es producir secuencias “extendidas”. Estas secuencias extendidas de segmentos duros, actúan como partículas de relleno y como sitios de reticulación física que aumentan la resistencia mecánica. Entre los posibles reactivos para la síntesis de polímeros biodegradables están los aminoácidos, la mayoría de los cuales forman proteínas y que no son tóxicos. Los aminoácidos se han empleado desde hace tiempo en la obtención de polímeros sintéticos, y se han empleado principalmente como extensores de cadena. El aminoácido empleado como extensor de cadena, hace al poliuretano reconocible por un agente biológico^{97,98,97,99}.

1.9.3.3.1.2. L- Glutamina

La glutamina es el aminoácido no esencial más abundante del organismo con una composición característica que presenta dos grupos nitrogenados (un grupo amino y otro amida) y puede ser donador de nitrógeno para la purina y piridina en la síntesis de nucleótidos tales como el ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico mensajero (mRNA). El papel principal de la molécula de ADN es el almacenamiento a largo plazo de información. Por su parte, el ARNm contiene la información genética procedente del ADN para utilizarse en la síntesis de proteínas, es decir, determina el orden en que se unirán los aminoácidos^{100,101}. Entre las principales funciones fisiológicas de la glutamina destacan ser el componente y precursor para la síntesis de proteínas corporales, la síntesis de aminoácidos, azúcares y otros metabolitos¹⁰².

Se ha demostrado también que entre las funciones fisiológicas de la glutamina destaca por ser sustrato para la urea génesis y la gluconeogénesis hepática, inhibidor de la degradación proteica, estimulador de la síntesis de colágeno y precursor de neuro transmisores¹⁰³. La glutamina ha sido reconocida por jugar un papel único, en la proliferación de las células, en comparación con otros aminoácidos. Está involucrado en numerosas vías metabólicas en distintos órganos y sistemas, en el metabolismo intermediario celular y participa en el ciclo de Krebs como donante de grupos hidrocarbonados. Para ello, se hidroliza liberando amonio (procedente del grupo amino), transformándose en glutamato. Éste a su vez se transforma en α -cetoglutarato, liberando el amonio del grupo amida, y entrando en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos^{103,104,105}. La glutamina es también un sustrato esencial para algunas células clave del sistema inmune, tales como macrófagos y linfocitos. Se ha demostrado que la concentración plasmática de glutamina a la que se produce la máxima proliferación celular es de 0.5 mol/L. En medio de cultivo para el estudio citocompatibilidad se adiciona 5%. El mantenimiento de los niveles requeridos de L-glutamina en cultivo celular a menudo requiere la suplementación repetida al medio aunque este procedimiento puede llevar a niveles tóxicos por acumulación de amoniaco, así como su posible contaminación^{106,101}. Estudios recientes han proporcionado pruebas de que la glutamina puede convertirse en "condicionalmente esencial" durante condiciones inflamatorias tales como infecciones y lesiones. Ahora está

bien documentado que, en condiciones apropiadas, la glutamina es esencial para la proliferación de células, que puede actuar como combustible respiratorio y que puede mejorar la función de las células inmunes estimuladas. Hasta la fecha, se han determinado el efecto de la concentración de glutamina extracelular sobre la proliferación de linfocitos y la producción de citoquinas, macrófagos, más actividades secretoras y muerte bacteriana de neutrófilos¹⁰⁰, otra de las células del sistema inmune. Este sistema tiene una importancia fundamental no sólo en la prevención o limitación de la infección, sino también en el proceso global de reparación y recuperación de una lesión. Por lo tanto, es de importancia en condiciones clínicas de trauma, sepsis, quemaduras y la recuperación tras la cirugía¹⁰².

La mayoría de los grupos amino de tales aminoácidos sobrantes se convierten en urea, mientras que sus esqueletos carbonados se transforman en acetyl CoA, piruvato o en otro intermediario del ciclo de ácido cítrico. Parte del amonio que se forma en la degradación de los aminoácidos se utiliza en la biosíntesis de los compuestos nitrogenados. El $^{+}\text{NH}_4$ excedente se convierte en ácido úrico para su excreción, mediante el ciclo de la urea^{103, 107}

1.9.3.3.1.3. Ácido ascórbico

La vitamina C o ácido ascórbico (AA) también conocido como ácido cevilámico o antiescorbútico tiene características reductoras por sus dos grupos donadores de protones. También es hidrosoluble y termolábil y se oxida en el aire con facilidad. Interviene en muchas reacciones metabólicas importantes y actúa como cofactor en las reacciones de hidroxilación en la síntesis de colágeno¹⁰⁸. Ejerce sus efectos sobre muchos procesos biológicos como la promoción de la absorción de la síntesis de colágeno, anti-oxidación, y el hierro. Promueve la diferenciación de células B, estimula a la producción del factor de crecimiento de hepatocitos, inhibe la síntesis de la melanina y aumenta la síntesis de colágeno¹⁰⁹. Es esencial para la formación de hueso, dientes y para reforzar paredes capilares. Inhibe la inflamación de las encías, anemia, deficiencia en la cicatrización de heridas y susceptibilidad a las infecciones. El AA es esencial en la síntesis del colágeno, también interviene en la síntesis de lípidos, proteínas, norepinefrina, serotonina, L-carnitina, y en el metabolismo de tirosina, histamina y fenilalanina. También es importante en el metabolismo de carbohidratos y en el control de procesos infecciosos¹¹⁰. El ácido ascórbico es un potencial agente de quimioterapia

en el tratamiento del cáncer, continúa siendo ampliamente utilizado en algunos pacientes. Sin embargo, se encontró que una dosis alta de ascórbico induce la muerte celular¹⁰⁹. En cultivos de citocompatibilidad *in vitro* se utilizan 1% ácido ascórbico equivalente 0-15 g/l¹¹⁰.

Debido a su estructura química el ácido ascórbico es muy sensible a la degradación. Numerosos factores influyen en los mecanismos degradativos, entre ellos el pH, la concentración de oxígeno, las enzimas, los catalizadores metálicos, la concentración inicial del ácido y la relación ácido ascórbico (Acido D-Ascórbico) ADA. La degradación del ácido ascórbico se lleva a cabo mediante procesos oxidativos que resultan de la transferencia de dos electrones. Primeramente se origina el mono anión ascórbato (AH⁻), el cual, con la pérdida adicional de un segundo electrón, forma el ADA, altamente inestable y susceptible a la hidrólisis del anillo lactona^{110,111}.

1.10. Cerámicos

Existe una gran variedad de materiales cerámicos que pueden ser usados como implantes en el cuerpo humano, los cuales reciben el nombre de biocerámicas. Una de las características deseadas en este tipo de materiales es la bioactividad, la cual consiste en la formación de una interfaz estable con el tejido conectivo y que se igualen el comportamiento mecánico del implante con el tejido a reemplazar⁵⁵

Las biocerámicas se clasifican en cuatro tipos:

Bioinertes. No promueven respuesta biológica entre el material y el hueso; ejemplos de ello son la alúmina y la zirconia.

Porosas. Son cerámicas con arquitectura porosa que promueven el crecimiento del tejido dentro de los poros, en la superficie o a través del implante, permitiendo una fijación interfacial.

Reabsorbibles. Están diseñados para degradarse gradualmente con el tiempo y así ser reemplazados por el tejido natural del huésped. Entre los más conocidos se encuentra el fosfato de calcio y los corales.

Bioactivas. Se definen como cerámicas que “promueven una respuesta específica en la interfaz del material, lo cual resulta en la formación de un enlace químico entre los tejidos y el material”, siendo los más destacados los vidrios bioactivos, la hidroxiapatita, y las vitrocerámicas bioactivas⁵⁴.

Un material para la reconstrucción o sustitución de tejidos es considerado bioactivo si logra una respuesta biológica específica en la interfaz del material, dando como resultado una unión entre el material y los tejidos⁵⁵. La hidroxiapatita (HA) y trifosfato de calcio (TCP) son los materiales cerámicos más usados en ingeniería de tejidos y órganos. Los cerámicos son frágiles y tienen poca resistencia a la tracción y su velocidad de reabsorción depende de la composición química¹¹².

1.11. Polímeros Híbridos

Se denomina material híbrido a cualquier material orgánico-inorgánico en que por lo menos uno de los componentes, está presente con un tamaño del orden nanométrico. Los componentes que constituyen los híbridos pueden ser moléculas, oligómeros, polímeros, agregados e incluso partículas. Por consiguiente, son considerados como nano compuestos o incluso compuestos a nivel molecular¹¹³

Las características de un material híbrido no sólo resultan de las contribuciones individuales de sus componentes, sino que existe un sinergismo que depende de la naturaleza química tanto de la parte orgánica como de la inorgánica, así como del tamaño y la morfología de los correspondientes dominios. El componente orgánico mejora las propiedades ópticas, eléctricas, electroquímicas, bioquímicas, etc. Por su parte, el componente inorgánico confiere propiedades mecánicas, térmicas, magnéticas, etc. Lo anterior permite tener materiales con propiedades multifuncionales las cuales pueden ser modificadas mediante las condiciones de síntesis y de los precursores adecuados¹¹⁴

Las redes híbridas se dividen en 2 clases:

CLASE I. Corresponde a todos los sistemas en donde no existe un enlace covalente o iónico-covalente entre los componentes orgánico e inorgánico. En estos materiales, los componentes

presentan enlaces débiles a través de puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones electrostáticas. Incluye sistemas híbridos donde uno de los componentes (orgánico, biológico o inorgánico tales como moléculas, oligómeros o polímeros) es introducido en la matriz de otro componente^{114,115,68}.

CLASE II. En estos materiales, por lo menos un porcentaje de los componentes orgánico y/o inorgánico están vinculados a través de enlaces químicos fuertes (covalente, iónico-covalente o enlaces ácido-base de Lewis). En estos materiales se incorporan polímeros orgánicos en redes inorgánicas de sílice generadas *in situ*, a través del método de sol-gel^{116,68,115}

1.12. Pruebas de biocompatibilidad.

El requisito fundamental para que un biomaterial pueda ser utilizada para fines biomédicos es que pueda coexistir con el organismo humano un efecto inapropiado o que desencadene un efecto no deseado, es decir debe ser biocompatible. La evaluación de la biocompatibilidad de un biomaterial, generalmente se refiere a la determinación de las interacciones biológicas que tienen lugar entre un biomaterial y su entorno¹¹⁷.

La actividad celular local juega un papel principal en el destino y funcionalidad del biomaterial y en la recuperación de cicatrización del tejido que lo rodea. Los cultivos celulares proporcionan un modelo de investigación en las interacciones entre las células y el medio que los rodea. Todos los materiales con posibles aplicaciones clínicas deben someterse a un riguroso *screening in vitro* de toxicidad y biocompatibilidad. Estos ensayos tienen ciertas ventajas sobre la experimentación *in vivo*, ya que permiten el estudio detallado de un tipo en particular de células sin la complejidad asociada a los modelos *in vivo* y deberían utilizarse como estudio preliminar antes de recurrir a un modelo animal. Los cultivos celulares, con un número limitado de variables, permiten la observación directa de las interacciones célula biomaterial¹¹⁸

1.13. Adelantos en poliuretanos y materiales compuestos híbridos utilizados para la regeneración ósea

Los polímeros sintéticos presentan propiedades químicas y físicas controlables donde su degradación es predecible y reproducible y que pueden ser modificados para cumplir con los requisitos específicos de diferentes aplicaciones. Por otra parte, son fácilmente procesables en formas y tamaños deseados. Estas propiedades se pueden ampliar considerando la variedad de copolímeros existentes, la posibilidad de obtener mezclas de polímeros y materiales compuestos tales como los materiales biocerámicos o los materiales naturales bioactivos. Sin embargo a menudo carecen de las señales biológicas inherentes que puedan promover respuestas de células, su biocompatibilidad, su bioestabilidad y una baja adhesión bacteriana¹¹⁹.

El diseño y el desarrollo de los andamios clínicamente relevantes para ingeniería de tejido óseo, ha hecho evidente que la biocompatibilidad del material de soporte es imperativo, una matriz con degradación controlada es deseable y la resistencia mecánica debe coincidir con los de cualquier hueso cortical o trabecular al principio hasta que se produce la formación de hueso óseo^{46,120}. Además, la esterilización no debe alterar las propiedades donde la presencia de porosidad es también una consideración importante. Como la pérdida de hueso puede ocurrir debido a un gran número de razones, existe una gran necesidad en el campo de la ortopedia, odontología y cirugía maxilofacial, ya que se generan defectos óseos de diferentes tamaños y ubicaciones en el cuerpo¹²¹. Las propiedades de estas matrices pueden mejorarse aún más mediante la incorporación de varios tipos de rellenos bioactivos, como hidroxapatita (HA), β -fosfato tricálcico (β -TCP) y varios vidrios bioactivos^{122,11,123}

Poliuretanos segmentados elastoméricos biodegradables tales como preparado con 1,4-diisocianato de butano, policaprolactona (PCL) como el macro diol biodegradable y tiramina-1,4 -diisocianato de butano como extensor de cadena biodegradable, han mejorado sustancialmente el módulo de almacenamiento, desde 52 a 278 MPa mediante el aumento del peso molecular de la PCL¹²². Del mismo modo, los materiales compuestos a base de poliuretano (pre polímeros terminados pentaeritritol con acetato de 2,6-diisocianato de

hexanoato o ácido glicólico) que contiene fosfato de calcio al 10% (β -TCP) se propusieron para aumentar la resistencia a la compresión 2 a 2.6 GPa aunque también aumentaron la viabilidad de osteoblastos¹²⁴.

Uno de los enfoques utilizados para el desarrollo de materiales a ser potencialmente utilizados como sustitutos de hueso, es por medio de materiales compuestos tipo esponja con una estructura celular interconectada. Se han empleado esponjas de poliuretanos biodegradables con diferentes características hidrofílicas³⁷. El uso de materiales poliméricos compuestos con HA mejoran la biocompatibilidad ya que estos materiales se unen a los tejidos del hueso cuando son implantados¹²⁵. La fase mineral es responsable de la resistencia mecánica (dureza) y la matriz polimérica proporciona elasticidad^{126, 127 128}

Dong et al.⁶⁹ reportó trabajos sobre la preparación y caracterización de materiales compuestos de poli(uretano) e hidroxiapatita para la regeneración del tejido óseo. En otro estudio Wei et al.¹²⁹ controló la morfología y observó el crecimiento de hidroxiapatita en la superficie así como crecimiento de tejido. El trabajo de Rangel et al.¹³⁰ estudió la hidrólisis enzimática de los materiales compuestos preparados con poliuretano poroso/hidroxiapatita, empleando papaína, ureasa y esterasa debido a que estas enzimas presentan alguna afinidad sobre algún enlace en el poliuretano. Rangel Vázquez et al.¹³¹ reportó el estudio de la hidrólisis enzimática de los materiales reforzados mezclados y soportados de poliuretano poroso/hidroxiapatita. La técnica utilizada fue la Espectroscopia por Transformadas de Fourier (FTIR) para determinar los grupos funcionales que disminuyen con la hidrólisis así como los productos de la degradación.

Así mismo, Oliveira et al.^{4, 132} ha reportado la formación de HA sobre la superficie polimérica mediante un método biomimético, donde se estudió la formación de fosfato de calcio en poliuretano, tratada previamente con tetra etil orto silicato (TEOS) después de la inmersión del poliuretano en un fluido fisiológico simulado (FFS). Martínez et al.¹³³ reportó el efecto de la composición de un polímero y la orientación molecular de la interface polímero/hidroxiapatita y el contenido de la hidroxiapatita con respecto a las propiedades mecánicas. Garino et al.¹³⁴ reportó materiales compuestos biodegradables realizados con PCL/HA como sustrato para regeneración ósea con tres concentraciones diferentes de

hidroxiapatita (13, 20 y 26%). Por otro lado Vasile et al.¹³⁵ evalúa las propiedades físicoquímicas y biocompatibles de algunos nuevos materiales compuestos poliuretano/hidroxiapatita (HAP/PU) en contacto directo con MSCs *in vitro*. Shor et al.¹³⁶ fabricó andamios tridimensionales de PCL/HA (25% concentración por peso de HA) con interacción *in vitro* de osteoblastos, controlando el tamaño de poro, obteniendo un 60 y 70% porosidad así como su conectividad diseñado para ingeniería de tejidos en hueso.

Zhang et al.¹³⁷ manufacturó un material compuesto, polímero reforzado con hidroxiapatita probando *in vitro* la biocompatibilidad para implantes maxilofacial adicionándole células de osteoblastos para su proliferación, diferenciación y formación de nódulos mineralizados, observando células viables y su actividad metabólica. Martínez et al.¹³⁸ sintetizó materiales compuestos híbridos poliuretanos/nano hidroxiapatita con diferentes concentraciones de nHA (0%, 10%, 20%, 30% y 40% masa). La nHA es adicionada *in situ* durante la reacción de polimerización, obteniendo diferentes absorciones de agua así como su estabilidad térmica en función del contenido de hidroxiapatita. Asefnejad et al.¹⁹ estudia andamios porosos de poliuretanos con flúor–hidroxiapatita para uso como sustituto de hueso, obteniendo tamaño promedio de poros e incrementando el porcentaje del módulo a compresión.

En la actualidad se están elaborando materiales compuestos con poliuretanos y nano hidroxiapatita para la regeneración ósea siendo estos, uno de los enfoques utilizados para el desarrollo de materiales compuestos y ser potencialmente utilizados como sustituto de hueso¹⁴⁰.

La contribución de este trabajo es sintetizar poliuretanos segmentados biodegradables utilizando la ϵ -policaprolactona como segmento flexible, siendo éste autorizado por el FDA, y el diisocianato (HMDI), cuyos productos de degradación no son tóxicos. Finalmente, se propone la utilización de aminoácidos como extensores de cadena. El uso de la glutamina o el ácido ascórbico se basa en que estos compuestos tienen una actividad biológica para la regeneración ósea.

HIPÓTESIS

La síntesis de poliuretanos segmentados biodegradables con el ácido ascórbico estimulará la regeneración ósea necesaria para la formación del colágeno, mientras que la glutamina es un aminoácido esencial para el crecimiento de osteoblastos. Por su parte, la HA, también estimulará la regeneración ósea ya que ha demostrado ser biocompatible y osteoconductora y mejorará igualmente las propiedades mecánicas de la matriz polimérica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Obtener materiales compuestos a partir de nuevos poliuretanos segmentados e hidroxiapatita (SPU/HA) para regeneración ósea utilizando extensores de cadena de importancia biológica (glutamina o ácido ascórbico).

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Sintetizar poliuretanos segmentados biodegradables con policaprolactona (segmento flexible), 4,4'-metilen bis (ciclohexildiisocianato) y glutamina o ácido ascórbico como extensores de cadena.

Sintetizar materiales compuestos SPU/HA mediante dos métodos (*in situ* y mezcla mecánica).

Caracterizar fisicoquímica y mecánicamente los materiales compuestos SPU/HA

Estudiar la degradación de estos materiales en medios hidrolíticos (HCL y NaOH) y en medios oxidantes (H₂O₂).

Estudiar la degradación enzimática (ureasa, tripsina) de los poliuretanos sintetizados y sus compuestos.

Realizar estudios de biocompatibilidad mediante osteoblastos, por medio de los ensayos MTT y Alamar Blue.

Capítulo 2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiales

Para la preparación de los poli (uretanos) segmentados biodegradables, se utilizó como segmento flexible la poli- ϵ -caprolactona diol (PCL diol) con un peso molecular de 2000 g/mol. El diisocianato empleado fue 4,4'-metilen bis (ciclohexilisocianato) (HMDI) y como extensor de cadena se utilizó ácido ascórbico o glutamina (Tabla 2.1). La reacción fue catalizada con 2-etilhexanoato de estaño también conocido como octoato de estaño. Todos los reactivos anteriores fueron de la marca Sigma-Aldrich. Como disolvente en la síntesis se utilizó dimetil formamida (DMF) marca Fluka y para la preparación de películas se empleó tetrahidrofurano (THF) marca J. T. Baker.

Tabla 2. 1 Aminoácidos utilizados en la síntesis de los poli (urea-uretanos) segmentados

Extensores de cadena	Abreviatura utilizada*
Ácido ascórbico	AA
L-glutamina	GL

La reacción se llevó a cabo en atmósfera de nitrógeno. La PCL fue secada a 60°C bajo presión reducida durante 24 horas y la DMF secada en tamiz molecular. Las estructuras de los monómeros utilizados son mostradas en la Figura 2.1.

2.2. Síntesis de los poliuretanos urea segmentados (SPU's)

La síntesis de los diferentes poliuretanos se realizó por medio de una poli adición en dos pasos:

El primer paso consistió en la preparación de un prepolímero por medio de la reacción de la PCL diol con el diisocianato (HMDI) en proporción 1:2.05 y 0.3% de octoato de estaño como catalizador en disolución de DMF.

En el segundo paso, se hizo reaccionar el prepolímero con cantidades equimolares del extendedor de cadena. Para agregar los aminoácidos, éstos fueron disueltos en DMF (en el caso de la glutamina fue necesario acidular la solución para lograr que el aminoácido se disolviera). La reacción se llevó a cabo por 4 horas para el pre polímero y 2 horas de extensión a 60°C

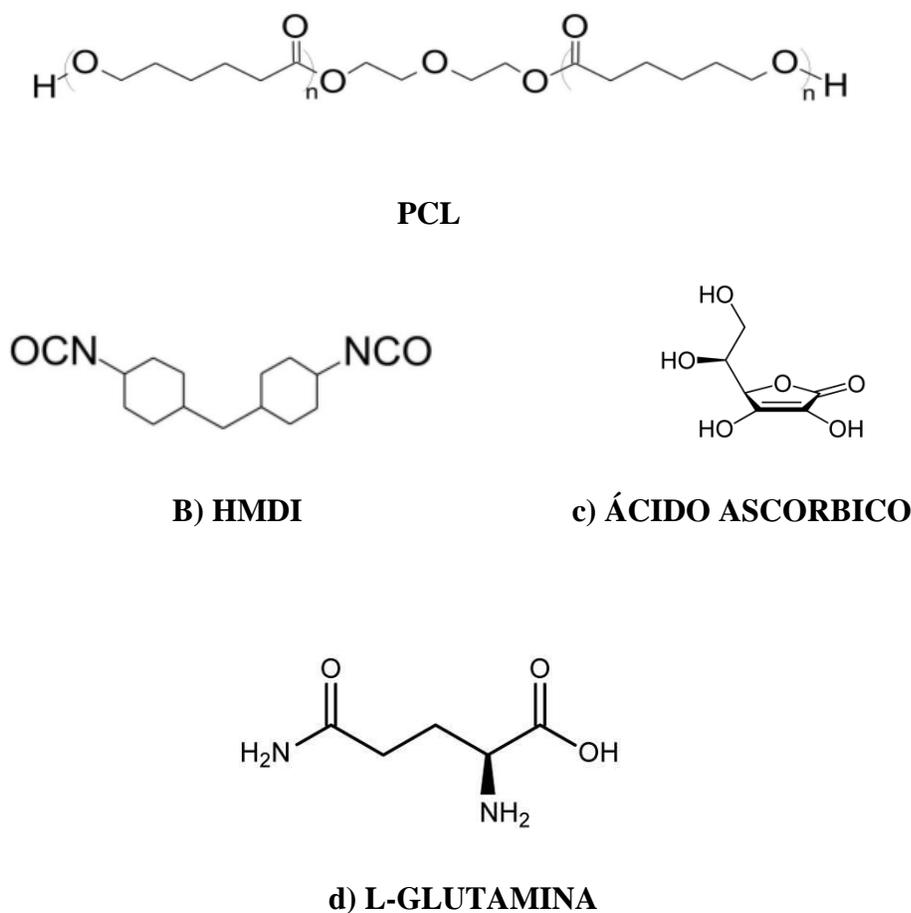


Figura 2. 1 Estructuras de los monómeros para la síntesis de SPU's, a) PCL diol, b) HMDI, c) Ácido ascórbico d) L-Glutamina

Una vez terminada la reacción se precipitó en agua destilada fría y se enjuagó varias veces el producto para detener la reacción y eliminar el monómero residual. El precipitado obtenido se secó a presión reducida a 60°C por 24 horas. La Figura 2.2a muestra la formación del polímero lineal mientras que la Figura 2.2b muestra las posibles reacciones de entrecruzamiento considerando la naturaleza multifuncional del extensor de cadena.

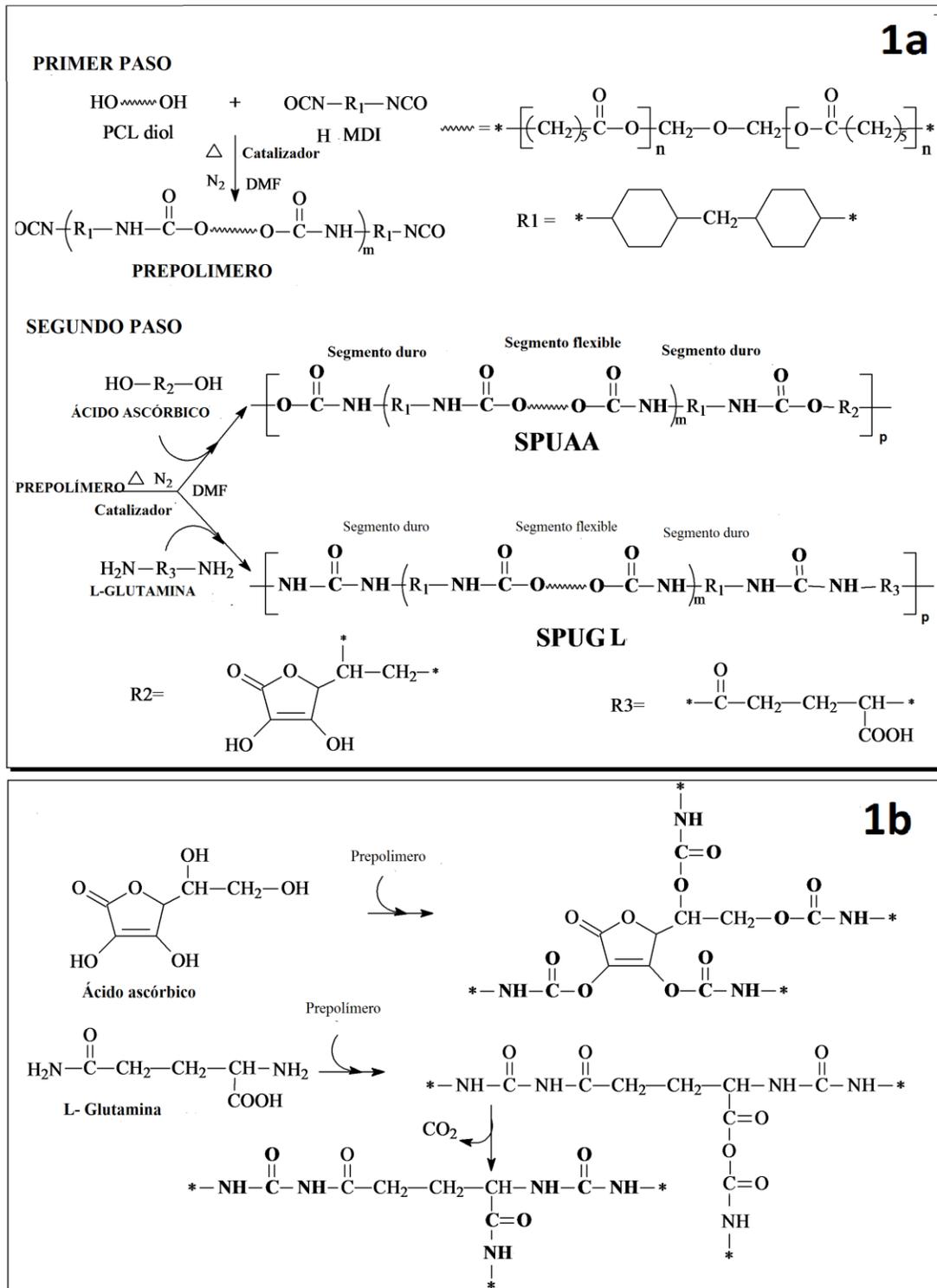


Figura 2. 2 Mecanismos sugeridos para la formación de poli (uretano-ureas) preparados con ácido ascórbico (AA) y glutamina /GL). a) Formación del polímero lineal y b) Formación del polímero entrecruzado.

2.2.1. Síntesis de los materiales compuestos de poliuretanos urea segmentados e hidroxiapatita (Método *In situ*)

La síntesis se efectuó por el método de dos etapas, utilizando las mismas proporciones y condiciones, tal y como se mencionó anteriormente. Durante la preparación del pre polímero se hizo reaccionar la PCL diol con el diisocianato (HMDI) por espacio de tres horas durante esta misma etapa se incorporó 10%, 15% y 20% (p/p) de HA y se dejó en agitación por una hora más.

La reacción de extensión se llevó a cabo de la manera citada anteriormente.

2.2.2. Síntesis de los materiales compuestos de poliuretanos urea segmentados e hidroxiapatita (Método de Mezcla)

Una vez obtenidos los poliuretanos segmentados con los diferentes extensores de cadena, se pesan aproximadamente 2 g del polímero y se disuelven en 30 ml de THF. Al mismo tiempo se dispersó la HA en 10 ml de THF mediante agitación mecánica. Posteriormente, se mezclaron la disolución del polímero con la HA dispersada y se continuó agitando. Finalmente la mezcla se vertió en un molde de Teflón para obtener una película. La nomenclatura y composición de las muestras obtenidas pueden observarse en la tabla 2.2.

Tabla 2. 2 Nomenclatura de los poliuretanos obtenidos (*in situ* y mezcla)

<i>SPU/HA</i>	<i>Abreviatura</i>	<i>SPU/HA</i>	<i>Abreviatura</i>
<i>SPU/H In situ</i>			
Ascórbico puro	AA-0	Glutamina pura	GL-0
Ascórbico 10 % HA	AA-I-10 %	Glutamina 10% HA	GL-I-10 %
Ascórbico 15% HA	AA-I-15 %	Glutamina 15% HA	GL-I-15 %
Ascórbico 20% HA	AA-I-20 %	Glutamina 20% HA	GL-I-20%
<i>SPU/HA mezcla</i>			
Ascórbico puro	AA-0	Glutamina pura	GL-0
Ascórbico 10% HA mezcla	AA-M-10%	Glutamina 10% HA mezcla	GL-M-10%
Ascórbico 15% HA mezcla	AA-M-15 %	Glutamina 15% HA mezcla	GL-M-15 %
Ascórbico 20% HA mezcla	AA-M-20 %	Glutamina 20% HA mezcla	GL-M-20 %

2.2.3. Elaboración de películas

En la figura 2.3 se indican los pasos para la elaboración de películas (0.1mm de espesor) para su posterior caracterización. Para la elaboración de estos materiales se utilizó 2 g de SPU's la cual se disuelve en 30 ml de THF, y una vez disuelto, se vierte en un molde y se espera en la evaporación del disolvente a temperatura ambiente (25°C) (figura 2.3). Se utilizó esta técnica por ser la más sencilla que puede ser llevada a cabo en el laboratorio y cuando se elaboran los materiales compuestos permite la incorporación de un mayor porcentaje de hidroxiapatita.

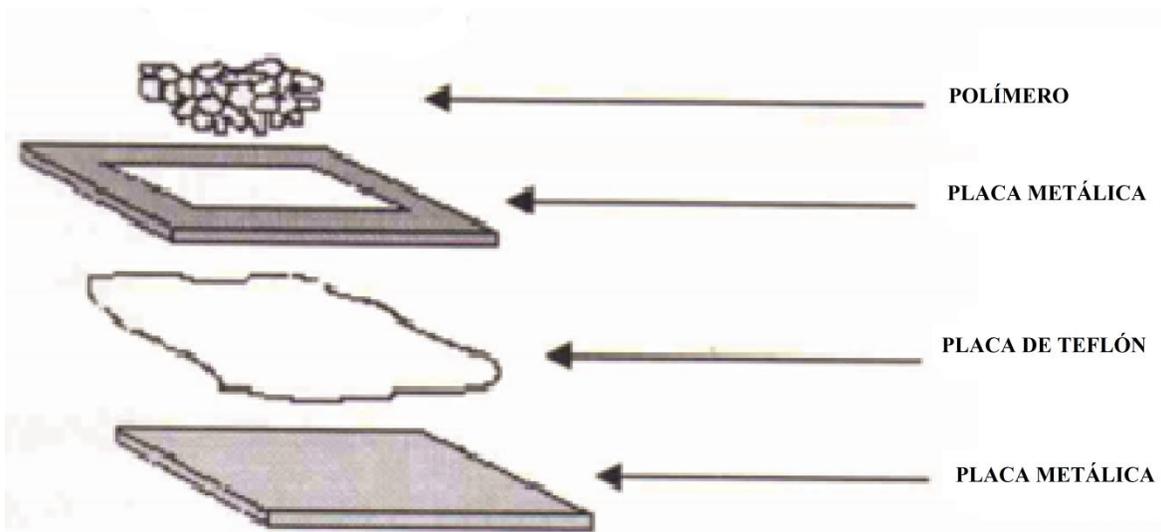


Figura 2. 3 Esquema de preparación de película para su caracterización

2.3. Caracterización fisicoquímica y superficial

2.3.1. Solubilidad

La solubilidad de los SPU's fue probada en THF, cloroformo, DMF y etanol. De acuerdo a los resultados de solubilidad, se obtuvieron películas de 0.1mm de espesor por evaporación de THF a temperatura ambiente (25°C), en un molde de teflón por un mínimo de dos días.

2.3.2. Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

La estructura y composición de los poliuretanos sintetizados se determinó en un espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier (Nicolet Protegé 460 Magna IR) Los espectros se obtuvieron en el intervalo espectral de $4000-400\text{ cm}^{-1}$, promediando 100 barridos y con 4 cm^{-1} de resolución.

2.3.3. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

El análisis por RMN se llevó a cabo mediante ^1H -RMN, en un espectrómetro Varían Unity de 500 MHz Los poliuretanos fueron disueltos en cloroformo deuterado (10 mg/ml).

2.3.4. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (MEB) (JEOL, JSM 6360LV) acoplado a un EDX (Oxford Instruments, INCA Energy 200), para analizar la morfología de la superficie de los poliuretanos y su composición elemental.

2.3.5. Difracción de rayos X (DRX)

Para analizar la cristalinidad de las muestras se utilizó difracción de rayos-X de ángulo amplio en un difractómetro Siemens D5000 con radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1.5416\text{Å}$) con un paso de 0.02° con un tiempo de 3s en el intervalo $2\theta=5 - 60$ grados.

2.3.6. Ángulo de contacto

La obtención del ángulo de contacto estático (θ) de los diferentes polímeros estudiados se llevó a cabo por medio de un equipo VCA Optima utilizando agua destilada. El ángulo de contacto (θ), es el ángulo formado por un líquido en la frontera donde las fases líquida, gaseosas y sólidas se intersectan. La forma de la gota es controlada por tres fuerzas de tensión interfaciales como se muestra figura 2.4. El valor de θ , es una medida cuantitativa de la mojabilidad de un sólido por un líquido determinado. La descripción teórica del contacto apareció como la consideración del equilibrio termodinámico de tres fases: la fase líquida de la gota (L), la fase sólida de la superficie (S) y la fase gas del aire del ambiente (V) (la cual es una mezcla de la atmósfera ambiente y una concentración equilibrada de vapor del

líquido). La fase V puede ser incluso otro líquido inmisible. En el equilibrio el potencial químico en las tres fases deberá ser igual. Sin embargo es conveniente enmarcar la discusión en términos de energías inter superficiales.

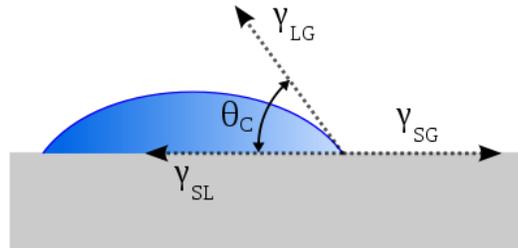


Figura 2. 4 Método de la gota para la determinación del ángulo de contacto

2.3.7. Determinación de los pesos moleculares

Los pesos moleculares fueron determinados por cromatografía de exclusión de tamaños (SEC). El análisis se realizó empleando un cromatógrafo de permeación en gel (GPC Agilent 1100) equipado con dos columnas (Zorbax PSM 60S y Zorbax PSM 1000S) y un detector de índice de refracción. Como eluyente se utilizó dimetil formamida (DMF grado HPLC) con un flujo de 1 ml/min a 50°C y sin LiCl. La curva de calibración se obtuvo con estándares de poliestireno (1 mg/ml en DMF) en el intervalo de 1050 a 420 600 g/mol.

2.4. Caracterización térmica

2.4.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los poliuretanos sintetizados fueron caracterizados mediante DSC utilizando un DSC-7 Perkin-Elmer. Para ello, muestras de 5 a 10 mg del polímero fueron encapsulados en charolas de aluminio y calentados de 0 a 170°C con una rampa de calentamiento de 10 °C/min., bajo una atmósfera de nitrógeno. Se registraron el primero y el segundo termograma para cada muestra.

El porcentaje de cristalinidad relativa (X_c) de la PCL en los SPU's fue determinada a partir de la entalpía de fusión usando la siguiente ecuación 2.1

$$\%X_c = \frac{\Delta H_f}{w_{ss} \times \Delta H_f^\circ} \times 100$$

(Ec.2.1)

Donde ΔH_f es la entalpia de fusión de la PCL obtenida experimentalmente de los SPU's, w_{ss} es la fracción en masa del segmento flexible y ΔH_f° es la entalpia de PCL 100% cristalina tomada como 136 J/g.

2.4.2. 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 650°C con una rampa de calentamiento de 10 °C/min., bajo atmósfera de nitrógeno. La temperatura de descomposición se reporta como el pico después de obtener la derivada de la curva de masa residual vs temperatura.

2.4.3. Análisis Dinámico Mecánico (DMA)

El análisis térmico 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., aplicando una fuerza estática de 90 mN, una fuerza dinámica de 70 mN y 1 Hz de frecuencia. Para este análisis se emplearon probetas con dimensiones aproximadas de 15 mm de longitud por 3.5 mm de ancho y 0.1 mm de espesor.

2.5. Caracterización mecánica

2.5.1. Ensayos Mecánicos de Tensión

Las pruebas de tensión se llevaron a cabo en una máquina de pruebas MINIMAT, con una celda de carga de 200 N y utilizando una velocidad de cabezal de 50 mm/min. Los especímenes fueron cortados con dimensiones de 15 mm x 2 mm x 0.11 mm dejando un espacio entre mordazas de 5 mm. Con estos ensayos se determinó el porcentaje de deformación (ϵ), la resistencia máxima (σ) y el módulo elástico de los SPU's.

2.6. Estudios de Degradación

2.6.1. Degradación en buffer de fosfato salino

Películas de SPU de 1.5 x 3 cm, con una masa aproximada de 50 mg, se degradaron en viales con buffer de fosfato salino (PBS) pH 7.4 con 5% de Tween a 37°C. La solución fue cambiada cada semana y se obtuvieron muestras a 8, 16, 30, 60, 90 y 120 días de degradación. El agua superficial fue removida con papel filtro y se pesaron las muestras para calcular el porcentaje de absorción de agua utilizando la ecuación 2.2 ¹⁴¹.

$$\%Absorción = \frac{m_f - m_i}{m_i} \times 100$$

(Ec. 2.2)

Donde m_f es la masa final de la muestra y m_i es la masa inicial de la muestra. Por su parte, para la determinación de pérdida de masa, las muestras fueron secadas a 60°C y presión reducida, una vez determinada la masa de la muestra seca, se empleó la ecuación 3.3

$$\%MasaPerdida = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100$$

(Ec. 3.3)

Donde m_i y m_f son la masa inicial y final de las muestras respectivamente, después de secar por 24 horas a 60 °C y a presión reducida.

El peso molecular de las películas degradadas en buffer de fosfato salino fue monitoreado por GPC como fue indicado anteriormente.

2.6.2. Degradación acelerada

La degradación acelerada se llevó a cabo por reflujo a 100°C por 24 h en soluciones de HCl 2M, NaOH 5M, H₂O₂ al 30% y agua destilada como control. Los residuos de la degradación fueron lavados y secados a 60°C y presión reducida. Se calculó el porcentaje de pérdida de masa con la ecuación 3.3. Únicamente las muestras preparadas con HA al 20% donde el cerámico fue incorporado *in situ* fueron estudiadas por cuestiones de tiempo.

2.6.3. Degradación enzimática

Películas de SPU de 1.5 x 3 cm con una masa de alrededor de 50 mg se colocaron en viales con una solución de tripsina y ureasa (Aldrich). Se adicionó 15 ml de cada enzima por separado (tripsina y ureasa) en viales a 37°C durante dos meses. La solución fue cambiada semanalmente para mantener la actividad de la enzima. Al término de este tiempo, la solución enzimática superficial fue removida con papel filtro, se pesaron y posteriormente se secaron a presión reducida y 50°C. La pérdida de masa fue calculada con la ecuación 2.3.

2.7. Ensayos de citotoxicidad

2.7.1. Cultivo Celular de Osteoblastos *in vitro*

En primer lugar se obtuvieron cultivos primario de osteoblastos alveolares (HOB) siguiendo el protocolo del trabajo descrito por Di Silvio en 1995 et al.^{142, 143}. Las células se cultivaron a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5%.

El medio de cultivo fue “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (DMEM), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FCS), un 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA), 0,02M de tampón ácido [4-(2-(hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico] (HEPES), L-Glutamina 2 mM, 100 unidades ml⁻¹ de penicilina y 100 µg ml⁻¹ estreptomina y 150 µg ml⁻¹ de ascorbato. El medio de cultivo se cambió cada tres días.

2.7.2. Ensayos indirectos de citotoxicidad MTT

Se realizaron métodos tanto directos, como indirectos, para determinar la citotoxicidad de los materiales. En los métodos indirectos, la citotoxicidad se mide tras exponer a las células a

los extractos acuosos de los materiales obtenidos a distintos tiempos de extracción. Los ensayos indirectos se basan en la medida de la acción de enzimas mitocondriales sobre sales de tetrazolio (MTT). En los ensayos directos, las células se ponen en contacto directo con los materiales y después de diferentes tiempos se tratan con tintes fluorescentes capaces de diferenciar las células vivas de las muertas por medio de la acción redox de células en el medio de cultivo (Alamar Blue).

2.7.2.1. Medio de elución

Se obtuvieron extractos acuosos tanto de los materiales ensayados, como de los controles DMEM como control negativo y etanol 10% como control positivo. Los materiales esterilizados se colocaron en 3 ml de medio (DMEM) para los estudios de elución. Los lixiviados fueron recopilados durante 24 y 48 h y las células fueron expuestas durante 24 y 72 h.

Los extractos obtenidos se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Todo el protocolo de trabajo se realizó bajo condiciones estériles.

2.7.2.2. Ensayo MTT

Los ensayos de citotoxicidad MTT [3-(4,5- dimetil-2 tiazolil)-2-5- difenil tetrazoilo] son usados en métodos indirectos y ensayos potencialmente citotóxicos y lixiviales. El reactivo MTT, es el más popular entre un conjunto de sales tetrazoilo, ya que puede ser usado en una amplia variedad de células. Durante el período de incubación, el succinato deshidrogenasa mitocondrial y el citocromo C de las células vivas toman parte en la reducción del MTT (figura 2.5). Como consecuencia de estos procesos metabólicos, aparecen cristales de formazán de color púrpura oscuro en forma de aguja, rodeando las células. La cantidad de formazán producido puede correlacionarse con el número de células vivas.

Los SPU's estériles se colocaron en 3 ml de medio (DMEM) para los estudios de elución. Las células fueron expuestas 24 y 48 h con extractos de SPUAA, SPUGL, SPUAA- I y SPUGL-I por un período de 24 y 72 h, el control negativo no tóxico DMEM y el control positivo tóxico es 10% etanol. A continuación, se añadió MTT a los pocillos, se incubaron 4

horas a 37 ° C y el medio fue aspirado. La sal insoluble formazán producido se disolvió utilizando 100 µl de sulfóxido de dimetilo (DMSO, Sigma D2650-grado de cultivo del tejido). Las placas se agitaron suavemente durante 5 minutos para asegurar la disolución completa y las densidades ópticas se midieron a una longitud de onda de ensayo 570 nm, restando la absorbancia de fondo a 620 nm de longitud de onda de referencia (Dynex Technologies, Chantilly VA). El porcentaje de viabilidad celular relativa (%VCR) fue calculado con respecto al control, usando la siguiente ecuación:

$$\%VCR = \frac{DO_S - DO_B}{DO_C - DO_B} \times 100$$

(Ec. 2.4)

Donde DO_S, DO_B y DO_C son las densidades ópticas de la muestra, el blanco (MTT en medio de cultivo sin células) y el control positivo, respectivamente.

Para evaluar el efecto citotóxico de los extractos de los materiales, los resultados fueron normalizados respecto al control negativo (TMX = 100 %) y se analizaron mediante análisis de varianza, ANOVA (p<0,05).

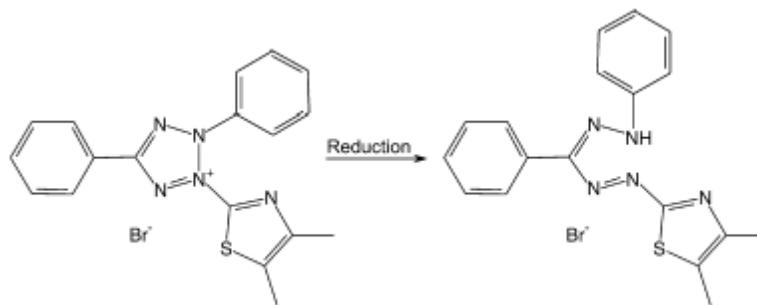


Figura 2. 5 Reducción de MTT

2.7.2.3. Ensayo de Proliferación de células (Alamar Blue™)

El ensayo de alamar Blue™ se basa en la reducción u oxidación del medio el indicador por células viables y sirve como una herramienta eficaz para evaluar la proliferación celular. En este ensayo se produce fluorescencia y cambio de color en respuesta celular. La reducción química del medio de cultivo se da por la acción del crecimiento y división.

La proliferación de células fue determinada usando Alamar Blue™ en SPUAA; SPUAA-I, SPUGL y SPUGL-I. El cultivo de tejidos y el medio fue modificado y el suplemento con 10 % etanol que fue usado como control negativo (non toxico) y el control positivo como toxico. La proliferación fue medida a 1,3, 7 y 14 días donde se sembraron células HOB en micro placas estériles de 96 pocillos en una densidad de 1×10^4 células/100 μ l/ pozo. Estos ensayos fueron realizados por triplicado.

Para evaluar el efecto citotóxico de los extractos de los materiales, los resultados fueron normalizados respecto al control negativo (TMX = 100 %) y se realizaron test estadísticos de ANOVA ($p < 0,05$).

Capítulo 3. Resultados y Discusiones

3.1. Esquema de polimerización

La síntesis de los poliuretanos segmentados se llevó a cabo por la vía de prepolímero (polimerización en dos pasos) usando un catalizador de Sn-Oct, siendo éste un método ampliamente usado a nivel laboratorio en trabajos anteriores^{97, 99, 144} utilizando diferentes amino ácidos como extensores de cadena. En este trabajo se planteó una nueva serie de poliuretanos con diferentes amino ácidos como extensores de cadena ya que el grupo amino, carboxílico e hidroxilos pueden reaccionar con el isocianato (HMDI) formando enlaces uretanos, urea y amida. También se plantearon dos tipos de procesos: *a) in situ*, donde la hidroxiapatita se adiciona durante la prepolimeración y *b) mezcla*, donde se utiliza el poliuretano puro y se le adicionan diferentes concentraciones de HA (10% 15 % y 20% w/w).

Parámetros como la temperatura, tiempo de reacción, disolvente y catalizador así como la composición del prepolímero y la proporción molar de los componentes, no fueron variadas, con el objetivo de aislar el efecto de los extendedores de cadena en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los SPU's. Por su parte los aminoácidos empleados como extensores de cadena fueron elegidos en base a actividad biológica.

Otro aspecto que puede influir en las reacciones para la formación de poliuretanos es la presencia de humedad, por lo que es necesario eliminarla tanto como sea posible (especialmente en la etapa del prepolímero) ya que el agua compite con los grupos hidroxilo del polioliol para reaccionar con el diisocianato y formen reacciones secundarias como ureas^{96, 145}

Los poliuretanos sintetizados son de tipo poliéster debido a la funcionalidad de la PCL. La PCL es semicristalina, no tóxica y es de gran interés para la liberación controlada de fármacos a partir de dispositivos poliméricos implantados por vía subdérmica. Sin embargo, el desarrollo tecnológico de PCL en este área está limitada por su corta vida útil (aproximadamente un año) y su alta cristalinidad. Por lo tanto, varios estudios han sido

dedicados a las mezclas de PCL y copolímeros con el objetivo de controlar la velocidad de biodegradación de este polímero y su cristalinidad. Algunos trabajos se han realizado con materiales híbridos orgánico-inorgánicos con la PCL ya que es atractivo para controlar simultáneamente estas propiedades y el comportamiento de la PCL¹⁴⁶. Las propiedades químicas y físicas de la PCL se verían influenciadas a baja temperatura. Los polímeros con poli ϵ - caprolactona pueden emplearse en la preparación de andamiajes para la ingeniería de tejidos, demostrando que mejoran las propiedades mecánicas de la matriz respecto a homopolímeros por separado. Se puede comprobar que estas matrices con PCL poseen buena biocompatibilidad y mayor estimulación de crecimiento y diferenciación osteoblástica¹⁴⁷.

La hidroxiapatita se utilizó por ser un cerámico osteoconductor, no tóxico, biocompatible y que refuerza el material compuesto. El tamaño de la hidroxiapatita tiene efecto sobre propiedades mecánicas y biológicas de los materiales compuestos¹⁴⁸. La incorporación de HA en matrices poliméricas otorga biocompatibilidad en el material compuesto ya que poseen la capacidad de establecer intercambios químicos y formar enlaces interfaciales con el tejido vivo, favoreciendo los procesos de integración y crecimiento del hueso nuevo. Los sistemas compuestos PCL-HA pueden obtenerse a partir del mezclado de PCL y HA o a partir de reacciones químicas (*método in situ*) donde las propiedades del material compuesto resultante dependen de diversos factores siendo los más relevantes la composición, la morfología y el tamaño de partícula del cerámico, y las características del área de contacto entre las fases¹⁴⁹. La HA es frecuentemente combinado con polímeros tales como el poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) o la ϵ -policaprolactona, polímeros son aprobados por Administración de Alimentos y Drogas (FDA por sus siglas en inglés) para uso de aplicaciones médicas^{123, 150}

3.2. Caracterización química y superficial

3.2.1. Solubilidad de los poli (uretano ureas) segmentados (SPU's)

Los resultados de las pruebas de solubilidad se muestran en la Tabla 3.1 donde se señala que se utilizaron disolventes con distinta polaridad. Los resultados obtenidos muestran que no existe entrecruzamiento de los poliuretanos ya que se observó la disolución total del material

tanto en THF como en DMF y acetona y fueron insolubles en agua y metanol. La solubilidad de un polímero dado en diversos disolventes se determina en gran parte por su composición química y su estructura¹⁵¹. Los polímeros se disuelven en disolventes cuyos parámetros de solubilidad no son demasiado diferentes. La solubilidad puede verse afectada por cualquier interacción específica, en especial enlaces de hidrógeno, morfología (cristalinidad), entrecruzamiento, temperatura y los cambios de temperatura. Un poli (éter uretano) es insoluble en cloroformo, THF, acetona y tolueno pero soluble DMF. La solubilidad en DMF de los poliuretanos sintetizados fue similar a la reportada en otros trabajo aunque también fue soluble en THF y cloroformo⁶⁶. Por otra parte, utilizando disolventes con diferente polaridad se observa que el poliuretano fue soluble en tetrahidrofurano, cloroformo, tolueno, acetona, dimetilformamida e insoluble en agua y metanol¹⁵².

Tabla 3.1 Solubilidad de poliuretanos con diferentes disolventes

SPU's	Agua	DMF	THF	Metanol	Acetona	SPU's	Agua	DMF	THF	Metanol	Acetona
AA-0	x	xx	xx	x	xx	GL-0	x	xx	xx	x	xx
AA-I-20%	x	xx	xx	x	xx	GL-I-20%	x	xx	xx	x	xx
AA-I-15%	x	xx	xx	x	xx	GL-I-15%	x	xx	xx	x	xx
AA-I-10%	x	xx	xx	x	xx	GL-I-10%	x	xx	xx	x	xx
AA-M-20%	x	xx	xx	x	xx	GL-M-20%	x	xx	xx	x	xx
AA-M-15%	x	xx	xx	x	xx	GL-M-15%	x	xx	xx	x	xx
AA-M-10%	x	xx	xx	x	xx	GL-M-10%	x	xx	xx	x	xx

X.- Insoluble

XX.- Alta solubilidad

3.2.2. RMN

Los SPU's fueron analizados por ¹H RMN para la determinación de su estructura química. En la figura 3.1 se observan los espectros de SPUGL y SPAAA donde los picos de la PCL predominan ya que se encuentra en mayor proporción como componente principal. Este análisis mostró picos característicos del polioliol, que consisten en PCL (4.05, 2.31, 1.67, 1.37 ppm) y pequeñas cantidades de etilenglicol (4.22 and 3.69 ppm); también se observaron las

3.2.3. Determinación de la composición mediante FTIR

Los poliuretanos segmentados preparados con prepolímero a base de HMDI y PCL diol utilizando ácido ascórbico como extensor de cadena da lugar a enlaces uretanos y amida mientras que cuando se usa L-glutamina se pueden formar enlaces urea y amida respectivamente. Los espectros de infrarrojo de los SPU's preparados con ácido ascórbico (AA) y glutamina (GL) son mostrados en la figura 3.2 (a, b y c, d) respectivamente. Estos espectros son muy similares entre sí, debido a la alta proporción de PCL observado picos característicos de los poliuretanos. De este modo, se observaron bandas de estiramientos a 3373 cm^{-1} que se atribuyen a la vibración del enlace N-H, mientras que las vibraciones de CH_2 asimétricas y simétricas se observan a 2946 y 2869 cm^{-1} respectivamente. El estiramiento del (C=O) aparece entre 1729 y 1760 cm^{-1} correspondiente al grupo éster de la PCL y el grupo uretano (NHCOO). La absorción de la amida II (uretano N-H flexión + C-N estiramiento) fue localizado en 1522 cm^{-1} , mientras que el pico a 1166 cm^{-1} es atribuido a las vibraciones de estiramiento de C-O-C en el segmento flexible (PCL). El pico 1636 cm^{-1} confirma los enlaces urea de la reacción de los grupos amina de la GL con NCO o de la presencia de agua (figura 3.3).

Los espectros de FTIR de los poliuretanos modelo obtenidos con HMDI y extensor de cadena (1:1) confirman que la glutamina reacciona con el diisocianato para formar enlaces urea mientras que los grupos carboxílicos reaccionan para formar grupos anhídrido inestables que resultan en la formación de la amida. Los poliuretanos que reaccionan con HMDI y ácido ascórbico forman enlaces uretano. Los grupos carbonilo del segmento flexible se observaron por medio de una banda intensa alrededor de 1733 cm^{-1} la cual enmascara las bandas del carbonilo del grupo uretano. Por su parte una banda menos intensa a 1636 m^{-1} confirmó la presencia de grupos urea formados durante la reacción de extensión.

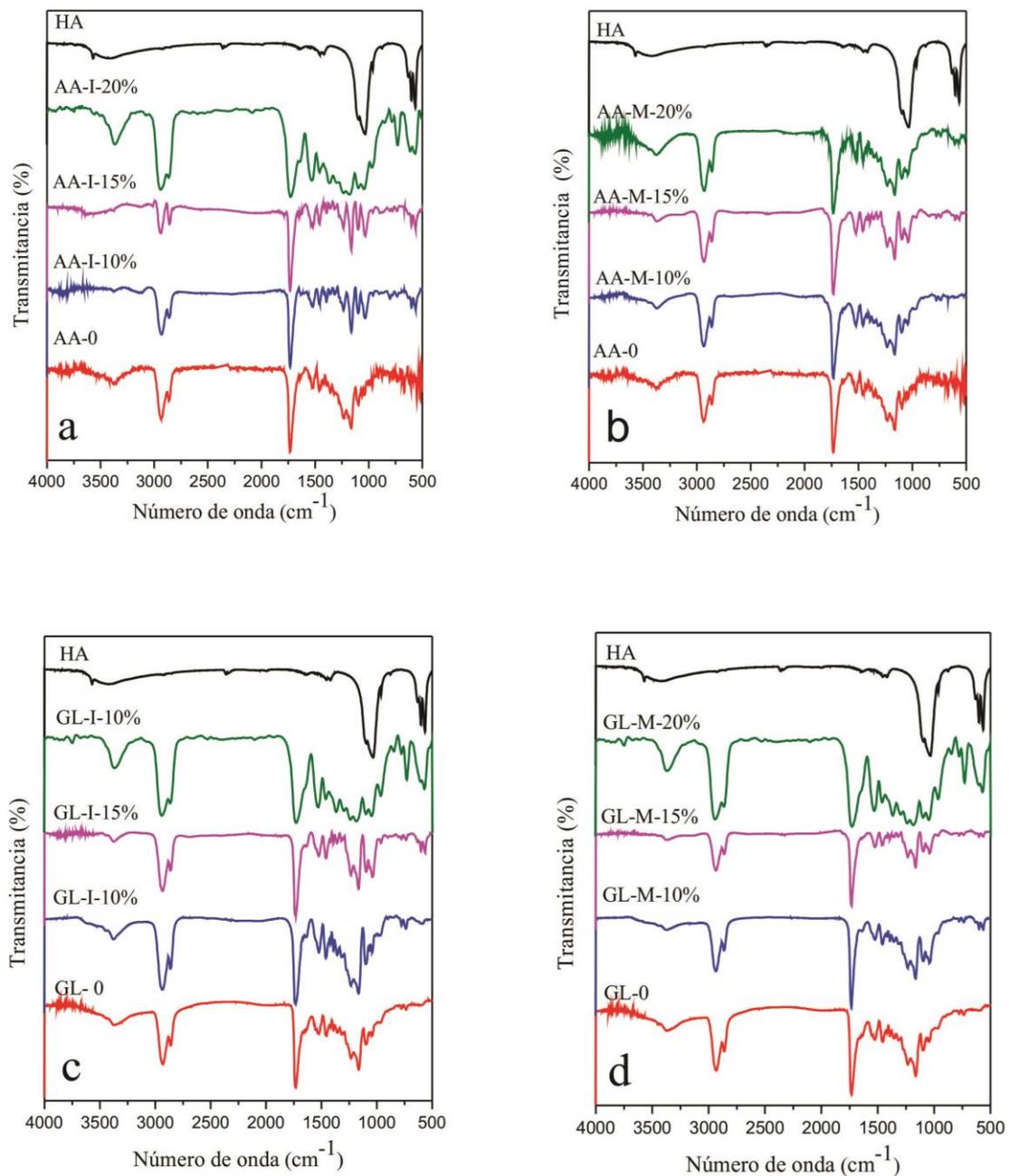


Figura 3. 2.-Espectros de FTIR de SPU's *in situ* (a) y (c) en mezcla (b) y (d) con 10, 15 y 20% HA.

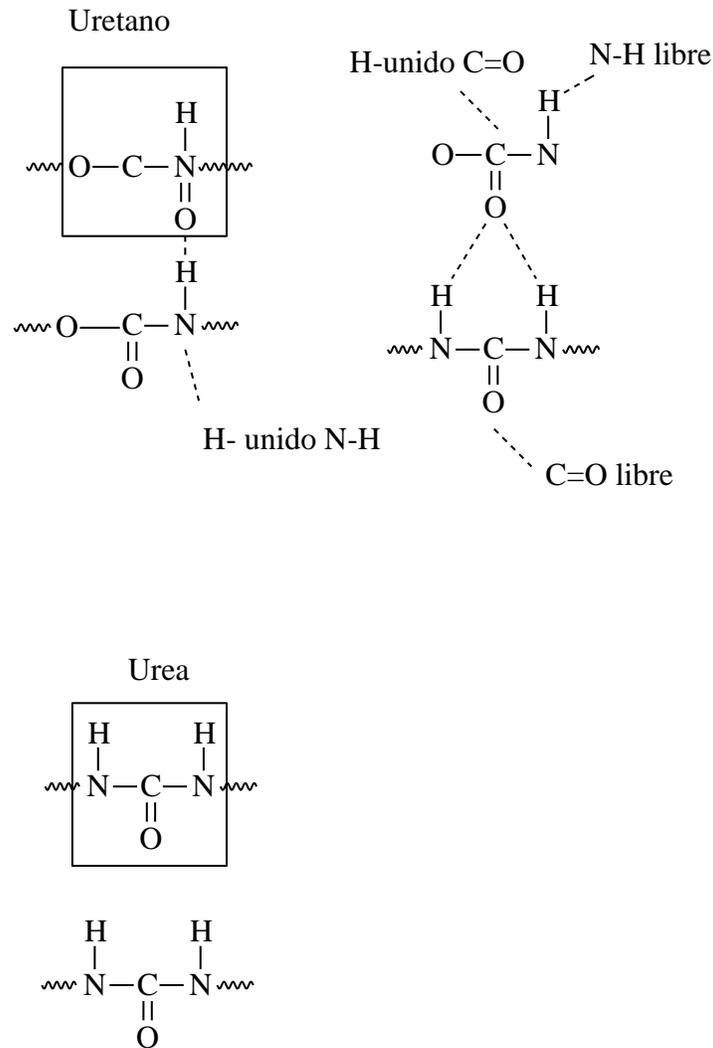


Figura 3. 3 Posibles interacciones entre cadenas intermoleculares en poli (uretano-urea) segmentados elastómeros ⁶⁵.

La presencia de HA en los materiales compuestos se verificó por picos a 565, 603 y 1032 cm^{-1} (PO_4^{3-}) a 1468 cm^{-1} (CO_3^{2-}) y 3365 cm^{-1} corresponde a la vibración de los iones hidroxilos (OH^{-1})(ver anexo A.1). En el material compuesto estas absorciones se encuentran sobrepuestas a las absorciones del poliuretano aunque son más notorias a una concentración del 20% de HA¹⁹. Las bandas del isocianato no aparecen lo que indica que la reacción fue completa, mientras que las bandas características de CO_2 ambiental se localizan en 2382 cm^{-1} y fue eliminada por efectos de análisis. En los espectros de SPUGL se observan bandas de urea (1631-1638 cm^{-1}) que son originadas por el agua que reacciona con el diisocianato. Los

poliuretanos y materiales compuestos preparados presentan diferentes grupos funcionales (uretano, éster, hidroxilo y ureas) y varios átomos de hidrógeno que son capaces de formar puentes de hidrógeno. Los grupos hidroxilos son capaces de enlazarse con los grupos carbonilos y carboxilos de los poliuretanos. La desaparición de los picos a 3500 cm^{-1} de los grupos OH de la hidroxiapatita podría atribuirse a la unión química con el diisocianato. Los grupos carbonilo del segmento flexible se observaron por medio de una banda intensa alrededor de 1733 cm^{-1} la cual enmascara las bandas del carbonilo del grupo uretano. Por su parte una banda menos intensa a 1636 cm^{-1} confirmó la presencia de grupos urea formados durante la reacción de extensión. Las interacciones competitivas de estos grupos rigen la separación de fases^{153,155,138}.

Espectros de IR similares han sido reportados en sistemas de poliuretano reforzados con HA por Zhihong et al.⁶⁹ con un poliuretano a base de nano- hidroxiapatita presentando bandas características de los poliuretanos, así como la banda del grupo fosfato, y la banda del grupo carbonilo. De igual manera, Tripathi et al.¹⁵⁶ observó bandas similares del grupo uretano así como del grupo fosfato y carbonato. Por su parte, Haohuai Liu et al.¹⁵⁵ reportó andamios porosos biodegradables no tóxicos de HA / PU, con bandas características del grupo uretano así como la incorporación del grupo fosfato de los cristales de HA, mostrando similitud con los cristales de apatita de hueso

3.2.4. Microscopia Electrónica de Barrido

Las micrografías obtenidas por el MEB (figura 3.4) mostraron la formación de superficies lisas cuando estas fueron depositadas en un molde de Teflón, durante su preparación por evaporación del disolvente (THF). Sin embargo son susceptibles a formar poros, mediante el método de preparación de la película, cuando la disolución del polímero es calentada, así como durante la evaporación rápida del disolvente durante la obtención de las películas.

En las micrografías por MEB de los SPU's se observó la formación de aglomerados (esferulitas) donde sus tamaños eran más pequeñas en polímeros que contienen glutamina. Cuando la HA se incorporó en los poliuretanos durante la formación del prepolímero, estas estructuras ya no eran visibles. Sin embargo, se observó una buena dispersión en la SPU's

aqueellos preparados con ácido ascórbico, mientras que se observaron áreas de HA ricos en poliuretanos que contienen glutamina (figura 3.4).

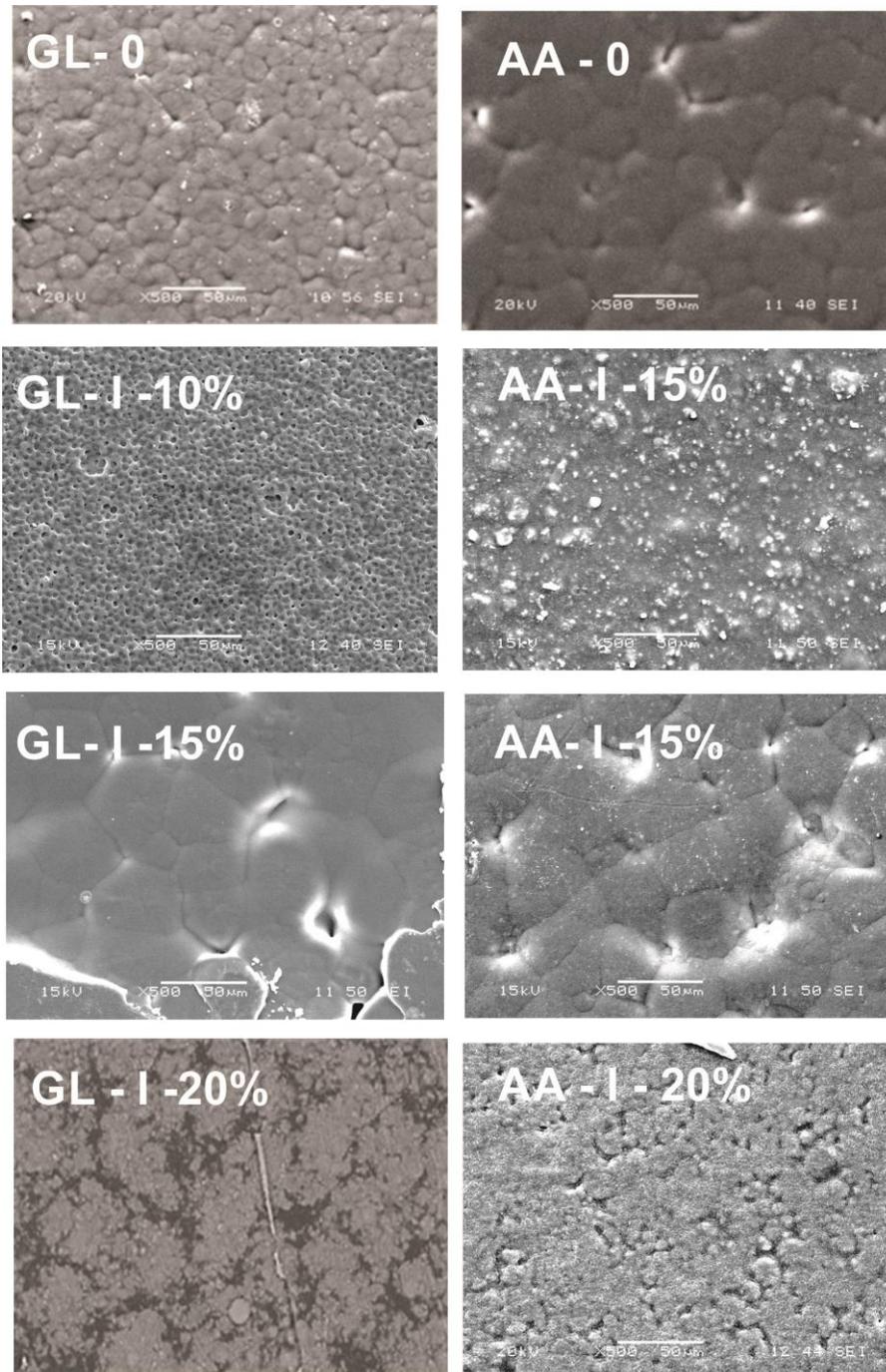


Figura 3. 4 Vista superficial de películas del método *in situ* obtenidas por evaporación de THF en un molde de Teflón

En los materiales compuestos de SPU/HA preparados mediante mezclado mecánico (figura 3.5), se puede observar que el aumento de tamaño de los aglomerados de grano, pero conservando una dispersión homogénea de cerámica¹³⁹.

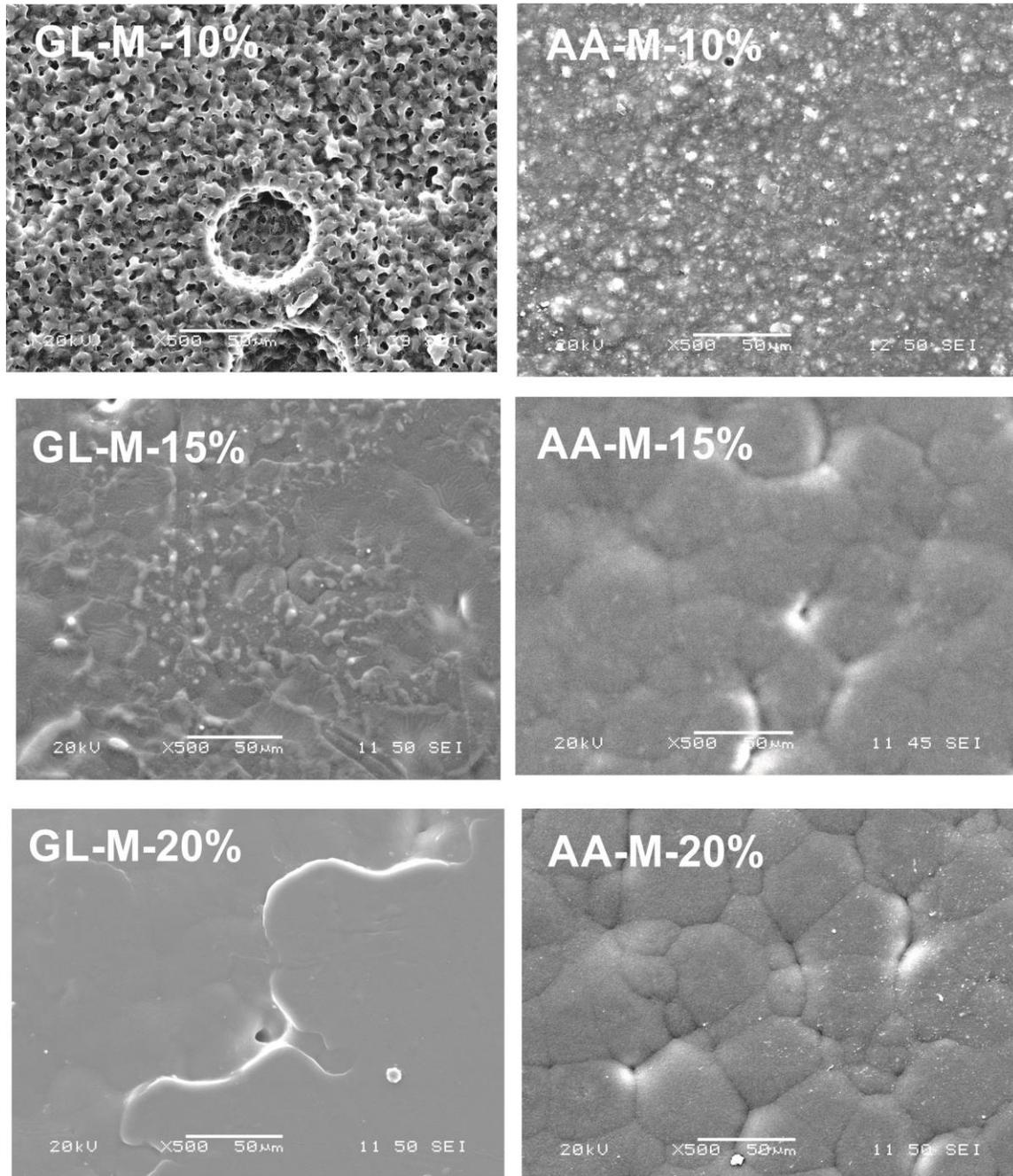


Figura 3.5 Vista superficial de películas del método mezcla obtenidas por evaporación de THF en un molde de Teflón

Una estructura similar fue observada en el trabajo realizado Aboudzadeh et al.¹⁵⁷ donde se observa la dispersión de la HA. Por su parte, Chandrasekhar et al.¹⁵⁸ registran que la HA es susceptible a integrarse dentro de la matriz con aglomerados no visibles a baja cantidad de partículas y que existen puntos más claros donde se concentra mayor cantidad de hidroxiapatita. La adición de las partículas de hidroxiapatita modifica la morfología del polímero, evidenciando la presencia de este en la matriz, promoviendo un paquete más denso en la fase cristalina con el material compuesto¹³⁴.

3.2.5. Ángulo de Contacto

Una gota depositada sobre la superficie de un sólido, también llamada gota sésil, pone de manifiesto la mojabilidad de dicha superficie. El análisis de su forma permite determinar magnitudes como el ángulo de contacto¹⁵⁹.

La tabla 3.2 muestra los valores del ángulo de contacto obtenidos en este análisis. Las superficies muestran un comportamiento hidrofóbico propio de los poliuretanos preparados con PCL diol debido los cinco metilenos presentes en su unidad repetitiva, además de la alta proporción de PCL presente en los SPU's sintetizados así como los materiales compuestos.

Sin embargo, no se observó una diferencia significativa en los SPU's y en los materiales compuestos. La mojabilidad es importante porque conduce a una mejor adhesión celular y desempeño biológico así como una mayor resistencia a la degradación de la superficie del material in vitro¹⁶⁰

Tabla 3. 2 Ángulos de contacto de poliuretanos segmentados preparados con AA, GL y HA

SPU's	Angulo de contacto (°C)	SPU's	Angulo de contacto (°C)
AA-0	76.0 ± 1.5	GL-0	62.8 ± 2.0
AA-I-20%	77.4 ± 1.0	GL-I-20%	82.1 ± 2.3
AA-I-15%	85.6 ± 2.3	GL-I-15%	81.3 ± 2.3
AA-I-10%	76.8 ± 2.3	GL-I-10%	79.5 ± 2.4
AA-M-20%	76.6 ± 3.1	GL-M-20%	75.4 ± 2.1
AA-M-15%	84.5 ± 2.3	GL-M-15%	80.4 ± 3.1
AA-M-10%	86.4 ± 2.1	GL-M-20%	80.0 ± 2.1

3.2.6. Difracción de Rayos X (DRX)

En los difractogramas de rayos X (DRX) de los SPU/HA obtenidos (figura 3.6) se observa que sobresalen los picos correspondientes a los ordenamientos cristalinos de la PCL ($2\theta = 21.3^\circ$, 22.0° y 23.4° (ver anexo A.3)) tal y como ha sido reportado para la PCL pura y confirmado al obtenerse el difractograma de la PCL utilizada. Este comportamiento es común en los poliuretanos sintetizados con PCL 2000 presentando un mayor porcentaje de cristalinidad comparado con poliuretanos sintetizados con PCL de menor peso molecular, los cuales tienden a ser más amorfos. La intensidad de los picos depende de la cristalización y está dado por el acomodamiento de las cadenas y los puentes de hidrógeno que pudieran darse principalmente en la PCL. La parte más ancha (base) del pico o halo se refiere a la parte amorfa del poliuretano sintetizado.

En los difractogramas obtenidos de los materiales compuestos también se observó que el patrón de difracción de la HA ($2\theta = 25.8$, 31.8 , 32.80 , 34.12 y 39.6 (ver anexo A.4)) se retuvo después de su incorporación a la SPU ya sea por mezclado mecánico o durante la formación del prepolímero. En base a esto, se puede decir que existe una buena dispersión durante la incorporación de la HA y estos resultados indican que el potencial osteoconductor de HA se mantiene durante su incorporación en la SPU. Este comportamiento se ha reportado en sistemas similares donde se ha comprobado que la presencia de PCL junta a la HA es un

factor importante que influye en propiedades del material como propiedades mecánicas y la rapidez de degradación¹⁶¹.

Trabajos similares fueron reportados por Liu et al.¹⁶² con andamios de materiales compuestos SPU / HA teniendo buena perspectiva para la regeneración ósea. Garima et al.¹⁵⁶ preparó andamios porosos con poliuretanos 50% de HA para la regeneración ósea; en los dos casos los resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo donde, se aprecian los picos de los poliuretanos así como de la alta cristalinidad de la hidroxiapatita.

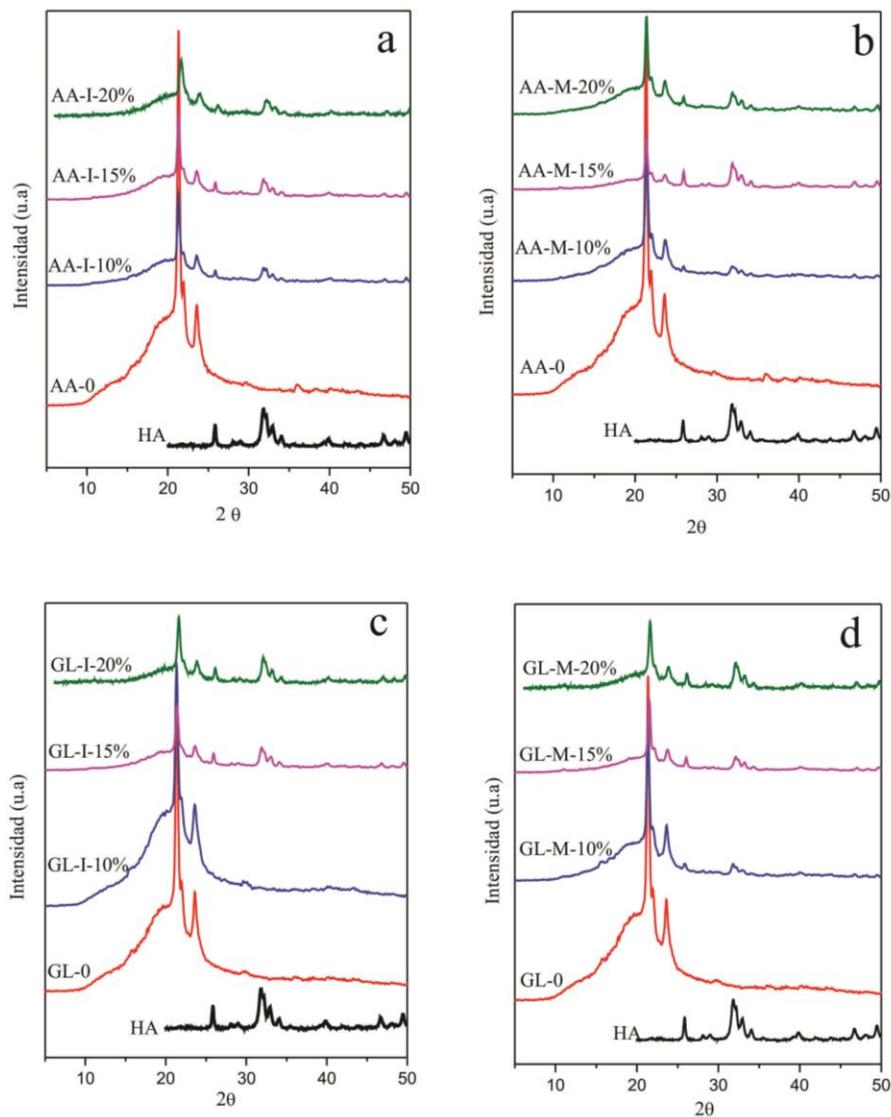


Figura 3. 6 Difractogramas de poliuretanos puros y materiales compuestos (*in situ*) a y c, (mezcla) b y d

3.3. Propiedades térmicas

3.3.1. Comportamiento térmico determinado por DSC.

En la figura 3.7, se muestra los termogramas de DSC todos los tipos de SPU's y materiales compuestos HA / SPU que contienen PCL como segmentado suave. Estos materiales fueron semicristalinos ya que exhiben picos de fusión endotérmicos alrededor de 50 °C y 53 °C. Esto se atribuye a la fase cristalina de la PCL (ver anexo A.2) ya que estos poliuretanos alifáticos no tienden a cristalizar. La presencia de un pico de fusión sugiere que la estructura cristalina de la PCL se conserva debido a su relativamente alto peso molecular (ca $M_n = 2000$)^{163,72}. Cuando la PCL tiene mayor grado de cristalinidad, funde a temperatura más altas y cristaliza a bajas temperaturas¹⁶⁴. Sorprendentemente, la inclusión de HA en el material compuesto tiende a reducir su cristalinidad (obtenido a partir de DSC) de 40% a 31% en SPUAA M, pero no tuvo ningún efecto de otras formulaciones.

También se observó que conforme va aumentando la concentración de hidroxiapatita añadida al polímero, aumenta su ΔH , ya que la incorporación de dicho material en la matriz del poliuretano probablemente funcione como sitio de nucleación. También se mostró una disminución de la cristalinidad al incrementar el contenido de hidroxiapatita, debido a la menor cantidad de PCL cristalina que contiene el poliuretano. La estructura cristalina y organización que posee en el primer calentamiento influyen en la intensidad y posición de los picos, correspondiente a la temperatura de fusión. Además mientras menos voluminoso fue el extensor de cadena, el segmento flexible se agrupa de manera ordenada y eso conduce a un incremento en la temperatura de fusión.

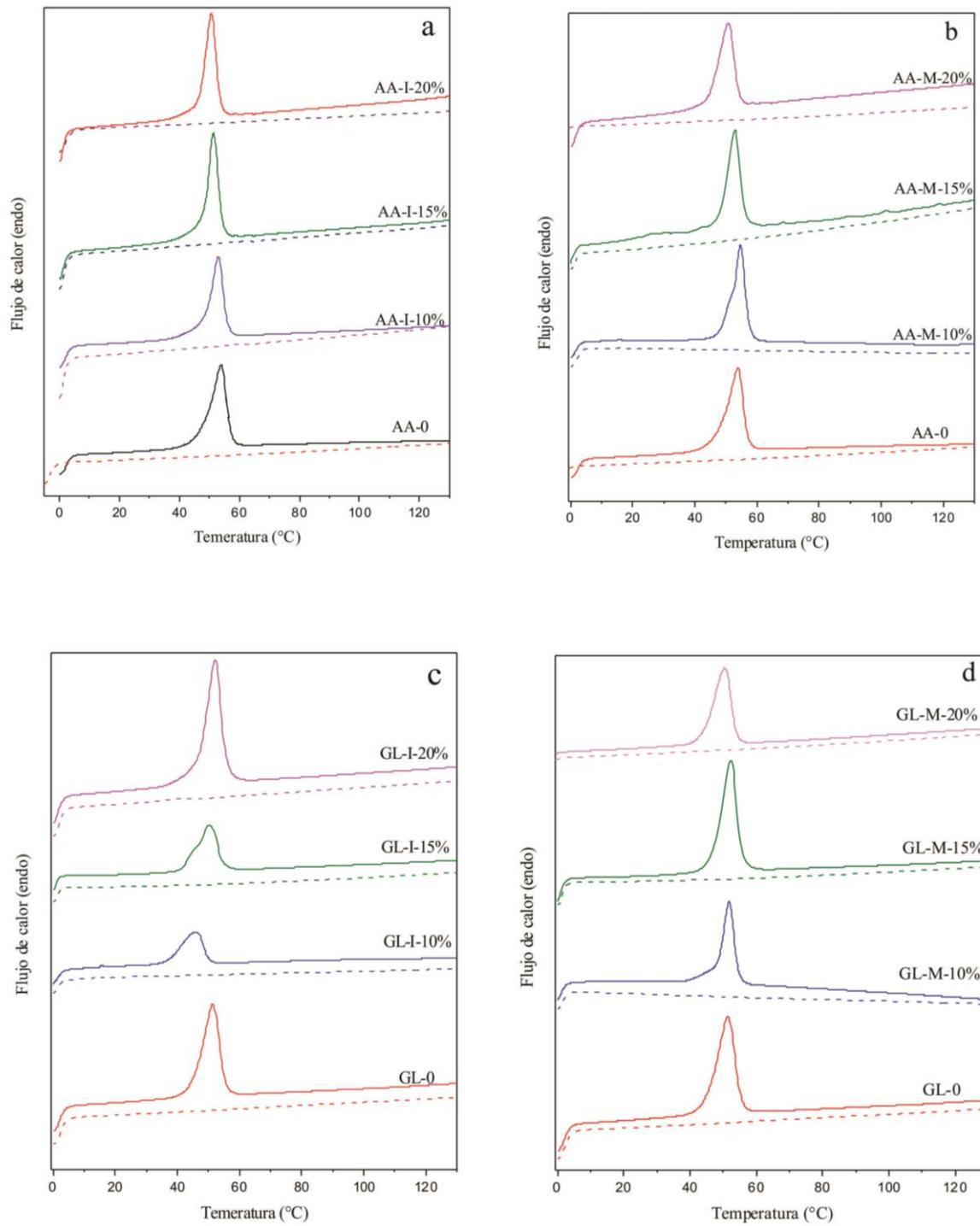
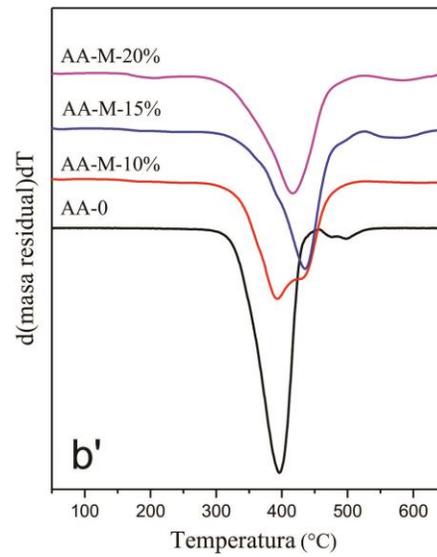
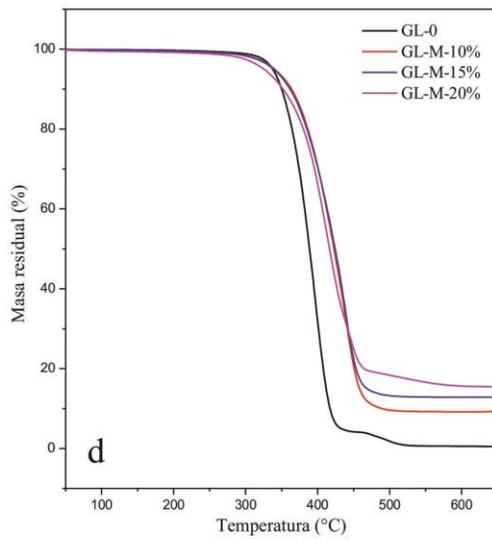
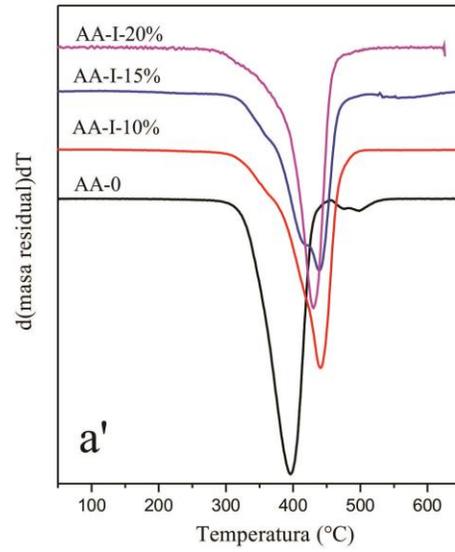
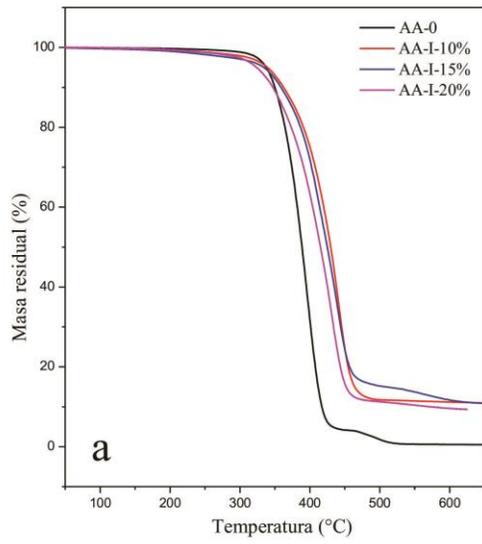


Figura 3. 7 Termogramas del DSC de poliuretanos puros y los materiales compuestos a y c (método *in situ*) b y d (método mezcla)

3.3.2. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico de los polímeros puros, mostró una temperatura principal descomposición a 396-397 °C, que se atribuye a la descomposición del segmento flexible (PCL) (ver figura 3.8). Esta temperatura se incrementó mediante la adición de HA con el efecto de ser más pronunciada cuando se añadió el relleno durante la síntesis del prepolímero. También se detectaron pequeños picos de descomposición a temperaturas más altas (442-436 °C), que fueron asignados a los segmentos rígidos¹¹, basado en el comportamiento térmico de los poliuretanos modelo sintetizados. La mejora de la estabilidad térmica se puede explicar debido a las interacciones entre la HA y la matriz de SPU, es decir, la formación de enlaces de hidrógeno entre el uretano (-NHCOO-) y OH de la hidroxiapatita. La menor tasa de pérdida de masa de HA / SPU-I en comparación con HA / SPU-M (18% vs. 20%) puede explicarse si se tiene en cuenta la posible reacción entre la hidroxiapatita y el HMDI durante la formación del prepolímero. El anexo A.5 resume las propiedades térmicas del SPU y de los materiales compuestos SPU / HA

En el trabajo reportado por Cai et al.¹⁶⁵ se reporta la descomposición de nanocompuestos entre 292°C y 310°C respectivamente y una pérdida de peso de hasta 50% con 40% de hidroxiapatita incorporada. Wenguo et al.¹⁶⁶ reporta que como productos de la descomposición se observaron componentes de fosfato de calcio a 350 °C. Chadrasejhar et al.¹⁵⁸ reporta que la pérdida de peso del polímero comienza alrededor de 310°C. Finalmente Nitzsche et al.¹⁶⁶ reporta que evalúa la composición cuantitativa de la hidroxiapatita pura con pérdida de masa entre 350 y 450°C. Esto significa, que en los termogramas de descomposición también deben considerarse los productos liberados por la HA por lo que se requiere un análisis más detallado en este sentido.



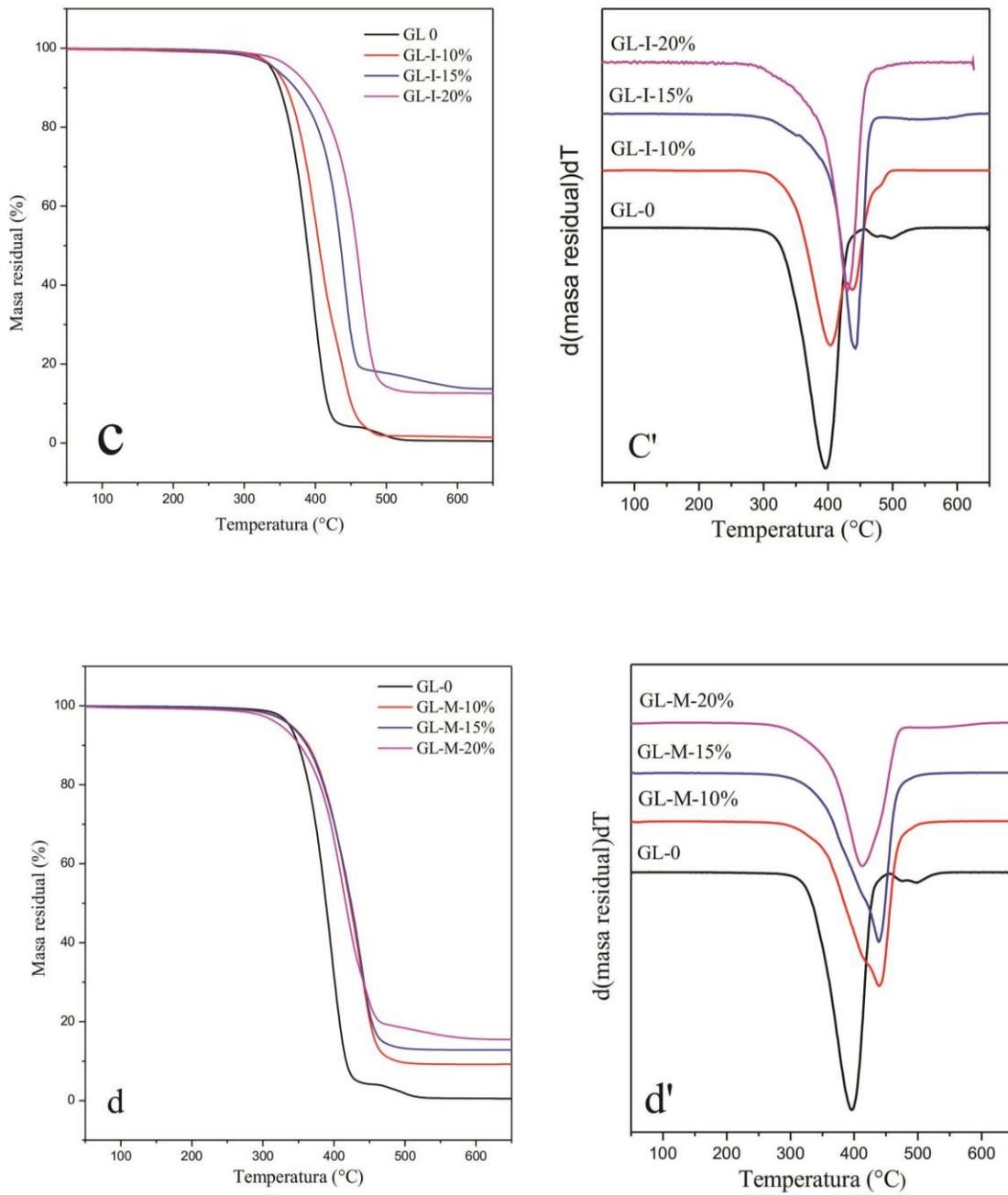


Figura 3. 8 Termogramas del TGA de poliuretanos puros y sus compuestos con hidroxiapatita. a), b) c) y d) es la derivada de la masa residual y a') b') c') y d') porcentaje de la masa residual utilizando AA y GL como extensor de cadena

3.3.3. Análisis Mecano Dinámico (DMA)

DMA permite observar diferentes tipos de transiciones y relajaciones para ser relacionadas con su morfología¹⁶⁷. En los termogramas de las figuras (3.9, 3.10) se muestran las variaciones de los módulos de almacenamiento (E') y el factor de disipación ($\tan \delta$) respectivamente. Se puede observar mayor rigidez en los materiales compuestos con el 20% de hidroxiapatita. Sin embargo los materiales compuesto al 10% presentan menor rigidez por su menor contenido de PCL cristalina; además existe una mayor facilidad para formar puentes de hidrogeno por los enlaces urea en caso de la glutamina, contribuyendo a su comportamiento elastomérico. Por otro lado, los materiales con ácido ascórbico muestran mayor rigidez ya que contienen grupos OH que forman uretanos aunque sufren una oxidación influenciada por la presencia de oxígeno e iones metálicos como (Fe^{3+}) y cobre (Cu^{2+}) que actúan acelerando la velocidad de reacción. Además, se sabe que el ácido ascórbico se degrada en su mono anión que puede interferir en la formación de puentes de hidrogeno. Por otra parte, la variación de $\tan \delta$ con la temperatura muestra una transición α bien definida alrededor de -40°C para los materiales compuestos *in situ* al 20%, donde esta transición puede relacionarse con la Tg del material¹⁶⁷. Esta transición se desplaza en materiales compuestos al 10 y 15% *in situ* y en mezcla indicando cierta miscibilidad del segmento flexible o entrecruzamiento entre las cadenas; además debe considerarse que la incorporación de la hidroxiapatita restringe la movilidad de las cadenas de los materiales compuestos¹⁵⁵. Los poliuretanos preparados con glutamina (figuras 3.10) mostraron una disminución del módulo de almacenamiento de hasta 3 órdenes de magnitud (típico de transiciones de materiales poliméricos rígidos a elastómeros) donde no hay un claro efecto del método de adición de la HA. Sin embargo, si existe una tendencia a tener módulos mayores con el aumento de la concentración de la HA, aunque con 10% y 15% los módulos fueron similares, probablemente debido a que el tamaño de la partículas de hidroxiapatita ($4.2 \pm 2.3 \mu\text{m}$) lo que contribuye a la restricción de la movilidad de las cadenas^{168,126}. así como un menor contenido de fase amorfa de la PCL. Trabajos de materiales compuestos reportan resultados similares a este como el trabajo de Liu et al.¹⁶² donde se reporta que el modulo (E') disminuye al incrementar la temperatura y que al incrementar el contenido de la HA, se observa un efecto de resistencia en la matriz del poliuretano. De igual modo, Meng et al.¹⁶⁹

reporta picos en $\text{Tan } \delta$ a -50°C que se le atribuye a la transición vítrea de la PCL y a 50°C correspondiente a la fusión de la PCL.

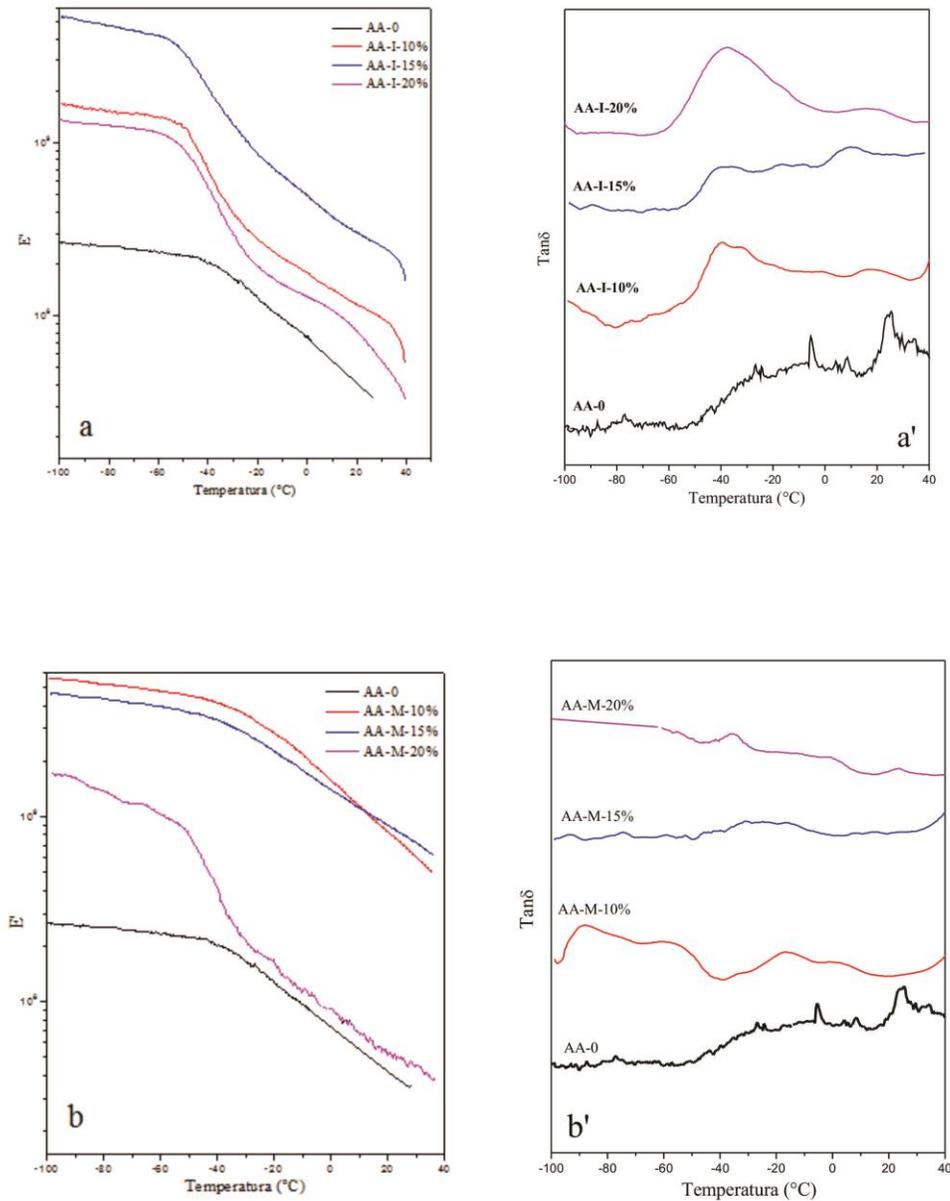


Figura 3. 9 Termogramas del DMA de poliuretanos puros con AA y sus compuestos con hidroxiapatita. a,a'y b,b' Módulo de almacenamiento vs. Temperatura.

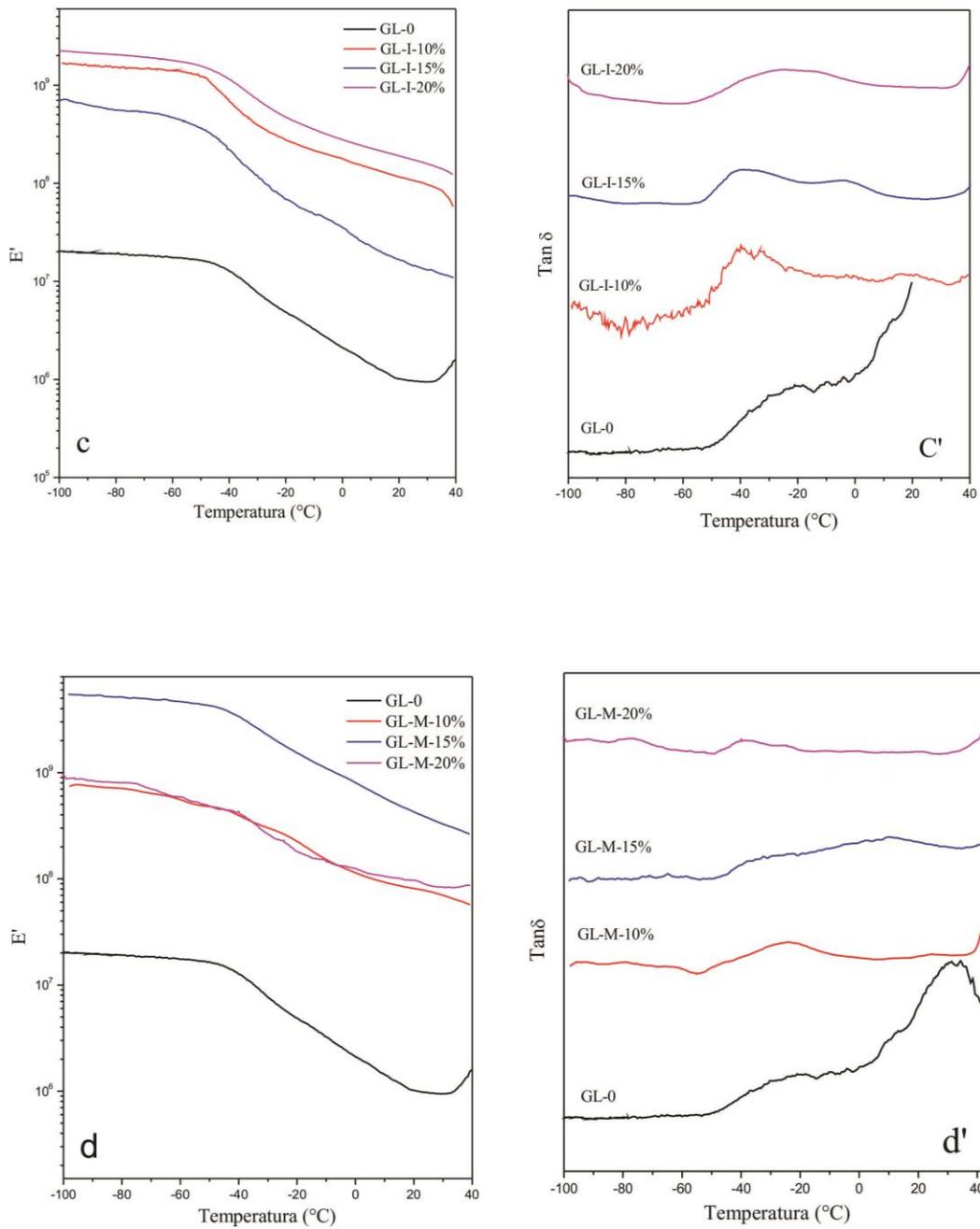


Figura 3. 10 Termogramas del DMA de poliuretanos puros con GL y sus compuestos con hidroxiapatita. c,c'y d,d' Módulo de almacenamiento vs. Temperatura

3.4. Determinación de la masa molecular.

En la tabla 3.3 se presentan las masas moleculares de los poliuretanos sintetizados y de los materiales compuestos las cuales fueron suficientemente altas para impartir alta resistencia y elasticidad en las películas preparadas por evaporación del disolvente. Sin embargo para los materiales compuestos preparados en mezcla presentan una distribución bimodal con una fracción de oligomero resultante en un material no elastomérico frágil. Los materiales compuestos con ácido ascórbico presentan bajo peso molecular posiblemente por la presencia de humedad durante las reacciones, donde el agua competirá con el diisocianato en reacciones secundarias indeseables, tales como la formación de urea y biuret o la formación de alofanato limitando así el peso molecular del polímero^{73,75}. El éxito de la extensión de cadena se debe a la reacción de los grupos amino con los grupos diisocianato siendo más rápida que la reacción del agua y el diisocianato^{170,91}.

Los pesos moleculares reportados para los materiales compuestos obtenidos por mezclado de la HA con la solución polimérica tuvieron un comportamiento no esperado ya que la misma matriz fue utilizada en todos los casos y no se esperaba una variación en este parámetro. Sin embargo, los compuestos se prepararon a tiempos diferentes lo cual sugiere que el peso molecular varió con el tiempo de preparación. Por otro lado, los pesos moleculares reportados en literatura de los poliuretanos basados en PCL en general son altos, sin embargo el aumento de la viscosidad del medio de reacción después de la etapa de la pre- polimerización más la hidrofobicidad de las cadenas disueltas en la PCL diol, limita la solubilidad del extensor de cadena (glutamina y/o ácido ascórbico). Durante la extensión de la cadena es evidente un aumento adicional de viscosidad que demuestra que la extensión se llevó a cabo; este aumento podría traer el límite la solubilidad del extensor de cadena por lo tanto una estequiometría desequilibrada y pesos moleculares bajos^{87,171}.

En el trabajo Rogulska et al.³⁶ se reportan altos pesos moleculares de polímeros, que son confirmados con GPC obteniendo Mn 75,540, Mw 386,600 aunque De Almeida et al.³⁷ reporta pesos moleculares similares a los obtenidos en este trabajo.

Tabla 3. 3 Pesos moleculares de poliuretanos y materiales compuestos

SPU's	M _n	M _w	M _w /M _n	SPU	M _n	M _w	M _w /M _n
AA-0	28,885	53,679	1.85	GI-0	75,490	153,540	2.03
AA-I-10%	92,858	134,340	1.44	GL-I-10%	176,060	296,780	1.68
AA-I-15%	81,846	117,060	1.43	GL-I-15%	77,563	125,710	1.62
AA-I-20%	30,065	82,631	2.74	GL-I-20%	177,490	225,850	1.27
AA-M-10%	58,381	68,621	1.78	GL-M-10%	49,212	153,300	3.11
AA-M-15%	33,100	65,462	1.97	GL-M-15%	49,335	111,000	2.24
AA-M-20%	19,578	58,456	2.98	GL-M-20%	52,147	176,20	1.55

3.5. Caracterización mecánica

3.5.1. Ensayo a tensión

Los materiales usados como injertos óseos deben presentar adecuadas propiedades mecánicas no solo durante su manufactura, sino también para soportar la carga requerida durante su desempeño *in vivo*. La evaluación de la resistencia a la tensión y a la deformación máxima son parámetros comúnmente reportados para este tipo de materiales. Estos pueden ser afectados por factores tales como el contenido de segmento flexible o rígido en la estructura del poliuretano, grado de empaquetamiento de macromoléculas, separación de fases, grado de entrecruzamiento, cristalinidad así como la incorporación de un cerámico^{172,126}.

Como puede observarse en la tabla 3.4, los SPU/HA obtenidos con ácido ascórbico presentaron un porcentaje de deformación de hasta 1634%, con una resistencia máxima de 24.5 MPa cuando contenían 20% HA añadida durante la polimerización. Estos valores fueron menores en términos de resistencia (σ) y módulo elástico (E) pero mayores en términos de deformación (ϵ), comparados con los obtenidos para la matriz sin HA. Los materiales compuestos preparados mediante la mezcla del cerámico presentaron propiedades inferiores en términos de su deformación ya que la HA no se logra dispersar homogéneamente, aunque el módulo (45.75 MPa) y la resistencia (11.99 MPa), fueron mayores comparado con los materiales compuestos *in situ*, al menos al 10% de HA. Por otro lado, el módulo elástico del

hueso cortical es de 16-23 GPa y 6-13 GPa su resistencia a tensión, con lo que se aprecia que las propiedades mecánicas de estos poliuretanos están muy por debajo del hueso cortical¹⁷³. El comportamiento de estos poliuretanos puede atribuirse principalmente a la matriz de SPU ya que una vez desdobladas y alineadas las cadenas de PCL se da a continuación un aumento en la resistencia. Sin embargo, las propiedades mecánicas también son reforzadas por los puentes de hidrógeno entre los carbonilos de la PCL o de los grupos uretano o urea y así como cualquier hidrógeno presente en el medio.

En contraste, los materiales compuestos obtenidos con glutamina *in situ* (ver Tabla 3.5) presentaron una deformación de hasta 1650% con 10% de HA añadida *in situ* y una resistencia máxima de 16.8 MPa. Sin embargo, también se observó que con un 15% de HA, la resistencia aumentaba probablemente debido a que se encuentran regiones ricas en HA por tanto se observaron deformaciones diferentes. En cuanto a los materiales compuestos donde la HA fue añadida por mezclado se observó, en general, una deformación menor (20.8%) y una resistencia más baja (4.9 MPa), para el contenido 15% de hidroxiapatita, probablemente debido a que no existe buena dispersión de la HA.

En general, se han reportado trabajos donde la morfología presenta dos micro fases, característica poliuretanos segmentados, excelentes propiedades mecánicas, tal como alta resistencia a la tensión y alta flexibilidad⁷². Existe un gran número de OH presentes en la superficie de la hidroxiapatita que pueden formar una unión covalente durante la formación del prepolímero. La unión covalente tiene el potencial de mejorar las interacciones con la interface de la matriz del material compuesto los que conduce a una mejora significativa en las propiedades mecánicas¹⁵⁵. Por otra parte, buenas propiedades mecánicas de poliuretanos se pueden obtener con un alto peso molecular, y con incrementar la longitud alifática del extensor de cadena, se incrementa la dureza, módulo de elasticidad y esfuerzo a tensión¹⁷⁴. Por último, el comportamiento elastomérico disminuye conforme se aumenta el cantidad de la hidroxiapatita¹⁶⁶. La dispersión de la HA en la matriz del poliuretano juega un papel muy importante, ya que puede causar concentraciones de esfuerzos, por lo tanto pobres propiedades mecánicas.

Tabla 3. 4 Propiedades mecánicas de los materiales compuestos con ácido ascórbico

SPUs	Esfuerzo máximo (σ , MPa)	Deformación (ϵ ,%)	Modulo elástico (E, MPa)
<i>In situ</i>			
AA-0	47.75 \pm 16.7	1298 \pm 285.6	26.77 \pm 285.6
AA-I-10%	21.0 \pm 3.08	1391 \pm 60.9	28.3 \pm 1.49
AA-I-15%	12.05 \pm 2.3	1380 \pm 141.3	14.50 \pm 7.2
AA-I-20%	24.50 \pm 3.6	1634 \pm 165	19 \pm 2.17

SPU's	Esfuerzo máximo (σ , MPa)	Deformación (ϵ ,%)	Modulo elástico (E, MPa)
Mezcla			
AA-M-10%	11.99 \pm 1.87	40.46 \pm 10.0	45.75 \pm 21.21
AA-M-15%	11.75 \pm 2.12	39.72 \pm 5.6	33.86 \pm 11.78
AA-M-20%	9.18 \pm 0.56	27.1 \pm 10.13	39.7 \pm 8.20

Tabla 3. 5 Propiedades mecánicas de los materiales compuestos con glutamina

SPUs	Esfuerzo máximo (σ , MPa)	Deformación (ϵ ,%)	Modulo elástico (E, MPa)
<i>In situ</i>			
GL-0	19.66 \pm 11.23	1879 \pm 302.4	12.0 \pm 2.26
GL-I-10%	16.8 \pm 3.7	1650 \pm 205.4	13.60 \pm 6.7
GL-I-15%	19.0 \pm 3.7	1291 \pm 421.3	10.22 \pm 2.3
GL-I-20%	14.44 \pm 1.81	1561 \pm 261.9	11.61 \pm 1.4
SPU's	Esfuerzo máximo (σ , MPa)	Deformación (ϵ ,%)	Modulo elástico (E, MPa)
Mezcla			
GL-M-10%	6.01 \pm 2.8	27.75 \pm 4.7	28.63 \pm 13.8
GL-M-15%	4.93 \pm 1.41	20.80 \pm 3.7	25.22 \pm 5.7
GL-M-20%	8.95 \pm 1.6	39.04 \pm 14.7	36.77 \pm 11.2

3.6. Degradación

3.6.1. Degradaciones aceleradas

Las degradaciones se llevaron a cabo en condiciones extremas de temperatura y pH con el fin de entender la degradación SPU ya que se enfrentará a medios hidrolíticos y oxidantes dentro del cuerpo, generado por los mecanismos de defensa. El peróxido de hidrogeno tiene un efecto marcado en el peso molecular de los poliuretanos. Las estructuras de uretano y urea son inherentemente hidrolizables bajo condiciones adecuadas. Sin embargo un segmento flexible tipo poliéter se considera estable a hidrolisis química simple, es decir, agua y solución salina que no son fuertemente ácidas o alcalinas.^{171,175.}

3.6.1.1. Pérdida de masa

La degradación acelerada llevada a cabo a los poliuretanos y materiales compuestos con 20% de HA y preparados *in situ* (Tabla 3.6) mostró que los medios alcalinos y ácidos tienden a degradar más a estos materiales que los medios oxidantes. En general, la hidrólisis ácida dio lugar a una pérdida de masa más alta, seguida por hidrólisis alcalina, debido a la alta proporción (74% calculado a partir de la estequiometria) de PCL en los poli (uretano ureas)^{176,58}. La degradación oxidativa, llevada a cabo con peróxido de hidrógeno mostró pérdidas de masa más bajas en comparación con la degradación hidrolítica ácida y alcalina pero superior al agua destilada. En las degradaciones hidrolíticas, el grupo éster de la PCL, es atacado principalmente y posteriormente el segmento rígido. Para el primer caso, los productos de degradación se espera que sea el ácido caproico mientras que para el segundo aminas alifáticas. Este efecto es típico de poliuretanos segmentados basados en poliésteres, no así en el caso de poliuretanos basados en poliéteres¹⁷⁷. En condiciones atmosféricas normales son estables a la degradación oxidativa, sin embargo los productos metabólicos presentes en situaciones biomédicas tales como peróxidos secretados por macrófagos pueden tener suficientes oxidantes¹⁷⁵.

Tabla 3. 6 Pérdida de masa (%) de poliuretanos preparados con ácido ascórbico y glutamina y sus materiales compuestos con HA

TIPO DE SPU	Degradación Hidrolítica			Degradación Oxidativa
	H ₂ O	HCL (2N)	NaOH (5M)	H ₂ O ₂ 30 % vol.
AA-0	1.34 ± 1.12	84.41 ± 0.93	34.5 ± 4.05	25.84 ± 2.63
AA-I-20%	3.52 ± 2.37	88.22 ± 2.43	46.3 ± 0.45	38.35 ± 0.11
GL-0	2.69 ± 1.80	82.60 ± 1.46	28.6 ± 0.66	26.58 ± 0.42
GL-I-20%	5.61 ± 0.69	90.22 ± 3.36	50.2 ± 1.25	44.97 ± 0.22

3.6.2. Degradaciones en Buffer (PBS)

La degradación de los SPU en buffer de fosfato salino a pH 7.4 y 37°C de temperatura se muestra en la Figura 3.11. Este tipo de estudios es usado para evaluar polímeros biodegradables puesto que estas condiciones son mucho menos agresivas y más representativas de condiciones fisiológicas. Por lo tanto, los tiempos de degradación son más lentos por lo que se fijaron tiempos de 8, 15, 30, 60, 90 y 120 días. La pérdida de masa fue menor en SPUGL y SPUAA que en SPUGL-I-20% y SPUAA-I-20% siendo estos valores similares a los obtenidos durante su degradación acelerada en agua destilada. En el caso del SPU con ácido ascórbico se observó una pérdida de masa de 4.5 % y 3% con glutamina. Al tiempo máximo estudiado, se observó una absorción de agua aproximada de 8% para ambos tipos de poliuretanos puros ya que la PCL al ser un poliéster alifático, es muy hidrofóbico. Este valor aumentó cuando la hidroxiapatita fue incorporada durante la polimerización desde los 20 días. La SPUAA-I- 20% absorbió hasta un 18% de agua mientras que en el caso de SPUGL-I-20% fue de 16%. La adición de HA al poliuretano pudiera afectar la velocidad de degradación en dos maneras. En la primera, la presencia de HA en la matriz perturba la formación de cristalitas de la PCL en el material compuesto haciéndolo más amorfo, lo cual resulta en una mayor velocidad de degradación. Sin embargo, la cristalinidad medida por DSC no fue afectada severamente. En el segundo caso, y el más probable para nuestro estudio, es que la adición de HA puede aumentar de manera global de la hidrofiliidad sobre la matriz y promover reacciones de hidrólisis⁶¹. La incorporación de hidroxiapatita dentro de

poliuretanos produce una degradación más rápida con altos contenidos de HA⁶¹. Por otro lado al incorporar hidroxapatita en los poliuretanos la absorción de agua se incrementó debido a la presencia del cerámico¹⁶⁵.

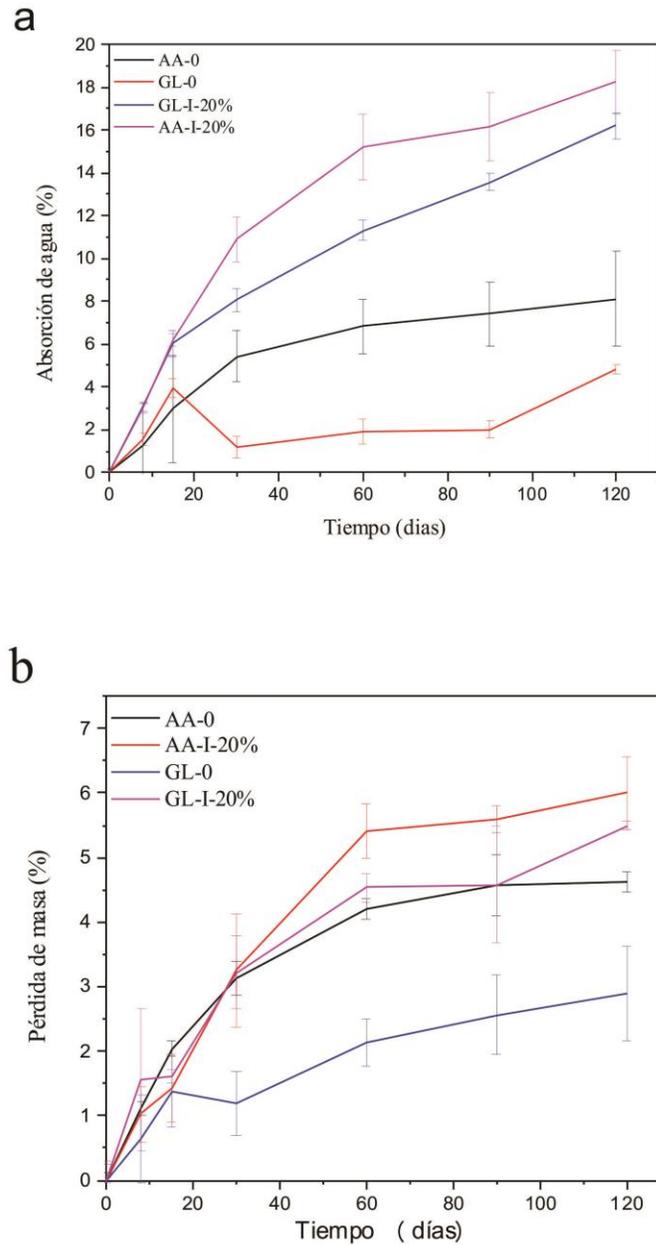


Figura 3. 11 Absorción de agua (a) y pérdida de masa (b) de SPU sintetizados con ácido ascórbico y glutamina

3.6.2.1. Caracterización por FTIR de los productos de degradación en PBS

Los espectros de FTIR (ver Figura 3.12) muestran que la degradación hidrolítica afecta principalmente los enlaces éster de la policaprolactona, ya que la banda de los carbonilos alrededor de 1733 cm^{-1} disminuye considerablemente en intensidad e incluso llega a desaparecer completamente como en hidrólisis alcalina. Las bandas anchas entre 2500 y 3500 cm^{-1} confirman la formación de grupos hidroxilo y carboxílico como producto de la escisión de los enlaces éster. Por su parte, los enlaces urea de la reacción de los grupos amina que se observan por medio de la banda de 1636 cm^{-1} tienden a ser más resistentes a la hidrólisis, aunque no se descarta que una proporción de estos enlaces se degrade de conformidad con los altos porcentajes de pérdida de masa observadas en especial por la degradación alcalina^{178,171}. La similitud de los espectros confirma la resistencia del segmento rígido a la degradación hidrolítica. Sin embargo, puede decirse que el segmento rígido es susceptible de degradarse por vía hidrolítica, aunque en menor medida, ya que las bandas de los carbonilos del grupo uretano se encuentran muy próximas al número de onda de los grupos éster que llegan a desaparecer.

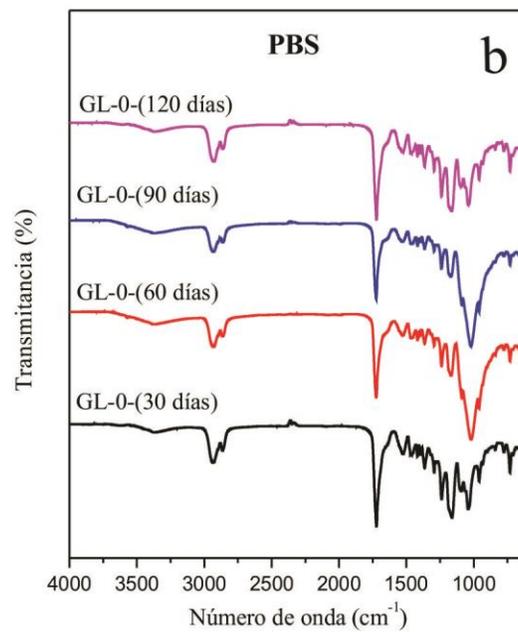
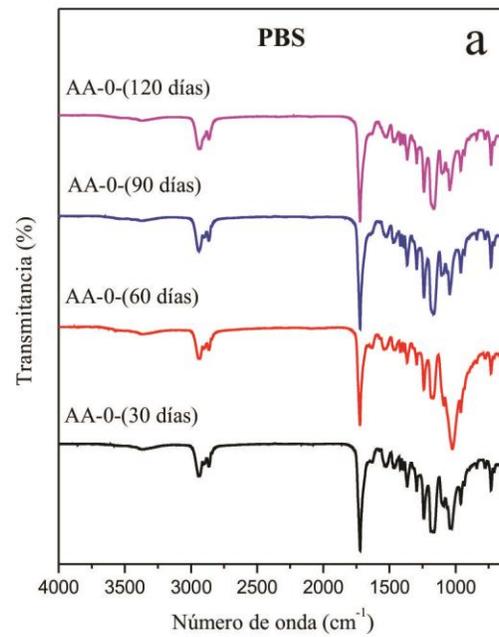


Figura 3. 12 Espectros de Infrarrojo de la degradación en PBS de los SPUAA y SPUGL puros a 30, 60, 90 y 120 días.

3.6.2.2. Peso molecular de los productos de degradación en buffer (PBS)

Los cambios observados mediante FTIR fueron comprobados por la reducción del peso molecular con el tiempo como se reporta en la Tabla 3.7. Los pesos moleculares se determinaron en intervalos de degradación en buffer por medio de GPC^{171,162}. Aunque la pérdida de masa observada durante la degradación en buffer no fue significativa en la mayoría de los poliuretanos, se pudo observar que se degrada mediante hidrolisis de las cadenas poliméricas. Esta disminución de masa molecular, sin pérdida de masa, se ha atribuido a una inducción de degradación, en el cual los polímeros experimentan una ruptura aleatoria de las cadenas sin pérdida de masa física significativa ni de sus grupos funcionales característicos^{154,179,168}

La mayor degradación de los materiales con aminoácidos, pese a tener mayor PCL cristalina, puede relacionarse con un incremento en la hidrofiliidad. En estos polímeros el contacto con aire orienta los segmentos hidrofóbicos hacia la superficie, pero al entrar en contacto con el agua los grupos polares presentes en los aminoácidos pueden migrar a la superficie incrementando la hidrofiliidad del material permitiendo así el contacto con los grupos hidrolizables.

Tabla 3.7 Variación del peso molecular de AA-0 y GL-0 durante la degradación en PBS

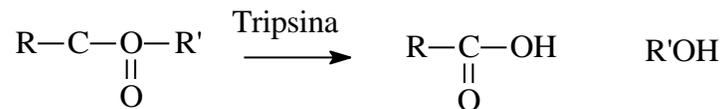
SPU	M _n	M _w	M _w /M _n
AA 2 meses	48,464	117,685	2.42
AA 4 meses	31,341	59,958	1.91
AA 6 meses	28,669	62.305	2.17
GL 2 meses	34,820	84,527	2,42
GL 4 meses	31,921	93.831	2.93
GL 6 meses	17,974	64,344	3.57

3.6.3. Degradaciones enzimáticas

Los polímeros utilizados en ingeniería tisular, deben ser degradados gradualmente en medios fisiológicos donde los productos de degradación puedan ser metabolizados *in vivo*. Este comportamiento puede ser acelerado por la acción combinada de ácidos, peróxidos, enzimas, presencia de iones metálicos, calcificación y las cargas que actúan sobre el implante¹⁴¹. La degradación enzimática fue simulada en este estudio utilizando tripsina y ureasa.

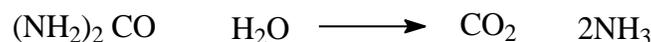
Tripsina

La tripsina es una enzima peptidasa, que rompe los enlaces de las proteínas mediante hidrólisis para formar péptidos de menor tamaño y aminoácidos. Es una enzima específica ya que liga al péptido en las posiciones del carboxilo de residuos de Arginina (Arg) o de Lisina (Lys), ambos aminoácidos con grupos R cargados positivamente, fragmentando al péptido inicial¹³⁰.



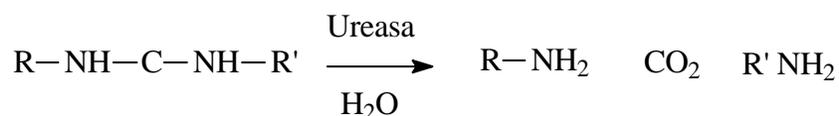
Ureasa

Por su parte, la ureasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de urea a dióxido de carbono y amoníaco dando la siguiente reacción:



La ureasa es específica en urea y agua, siendo inhibido por metales enzimáticos. La ureasa es una enzima que existe de forma natural que cataliza la hidrólisis de la urea en ácido carbámico inestable. La descomposición rápida del ácido carbámico ocurre sin catálisis enzimática para formar dióxido de carbono y amoníaco. El amoníaco es probable que escape de la atmósfera a menos que reaccione con agua para formar amonio. La enzima ureasa se encuentra en los leucocitos y se caracteriza por que afecta los enlaces de la urea y grupos amida del uretano.

Los tres enlaces más susceptibles a degradación hidrolítica en un poliuretano segmentado son el éster, la urea y el uretano^{180, 81}. El éster regresa a formar el ácido y el alcohol que le dio origen, siendo ésta auto catalizada por el ácido producido. Debido a esta naturaleza auto catalítica, la reacción de la hidrólisis es la más prevaleciente. El enlace urea se hidroliza en ácido carbámico no estable y amida estable. El uretano es menos susceptible y sigue el proceso de hidrólisis para formar ácido carbámico y alcohol¹⁸¹.



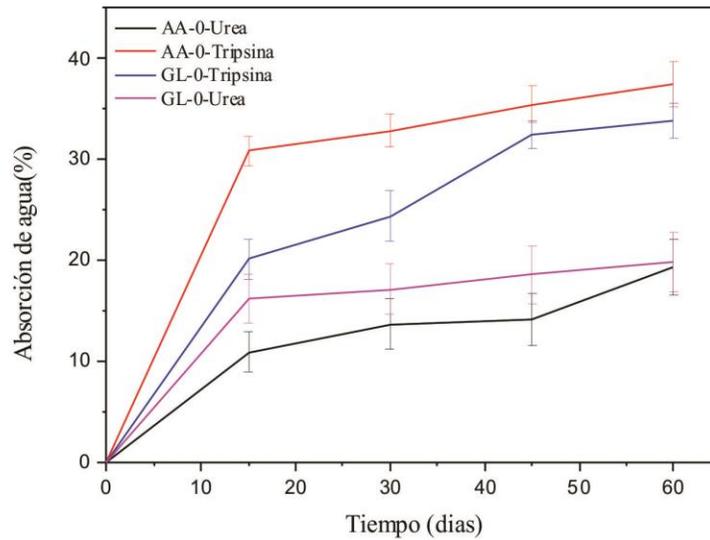
3.6.3.1. Absorción de agua y pérdida de masa

En la figura 3.13a se observa que la absorción de agua fue mayor cuando el poliuretano fue preparado con ácido ascórbico y cuando la degradación se llevó a cabo en tripsina, absorbiendo un 35% de agua con tripsina mientras que con la ureasa tuvo aproximadamente un 15%. Por otro lado, utilizando glutamina la absorción de agua fue menor con la ureasa, ya que tuvo una absorción de menor 30% en tripsina y 15% en ureasa; sin embargo no es significativa la diferencia en la absorción de agua entre ambas enzimas, esto es por ser un poliéster alifático con carácter hidrófobo por el mayor contenido de PCL dentro del poliuretano; por lo tanto siendo semicristalina la PCL reduce el volumen libre de absorción de agua¹⁷¹.

En cuanto a la pérdida de masa (ver figura 3.13b) observamos que AA-0 utilizando ureasa como enzima presentó una mayor pérdida de masa en comparación con la tripsina, esto es, 4.2% vs. 20% en tanto que la GL-0 obtuvo 8% vs. 15%, aunque estos valores no son considerados significativos por análisis de varianza Anova ($p > 0.005$). Se esperaba que utilizando la ureasa hubiera más pérdida de masa en glutamina y no en ácido ascórbico por su sitio de incisión de cadena; sin embargo, al observar que la tripsina obtuvo mayor pérdida de masa en AA-0 pudiera ser que el AA es muy inestable y susceptible a degradaciones oxidativas por lo tanto las incisiones de cadena pueden ser al azar, degradando tanto la parte flexible como rígida del poliuretano. Por otra parte la enzima fue cambiada cada tercer día

para mantener su actividad constante, ya que la reducción de su actividad disminuye de 30 a 40% cada 48 h.^{171,182}.

a



b

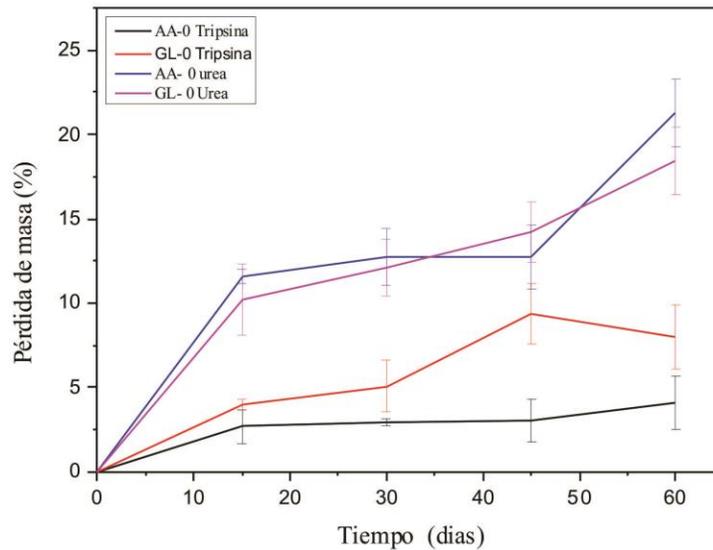


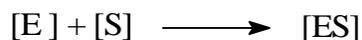
Figura 3. 13 Absorción de agua y pérdida de masa de SPAAA y SPUGL durante su degradación enzimática con tripsina y ureasa

3.6.3.2. Caracterización por FTIR de los productos de degradación enzimática

Estos cambios no fueron evidentes mediante espectroscopia de infrarrojo (ver Figuras 3.14) ya que se esperaba la disminución de la banda del grupo carbonilo a 1636 cm^{-1} relacionado con la urea, así como las bandas a 1217 cm^{-1} relacionadas con la amida III del grupo uretano. Sin embargo aunque hay que considerar que conforme pasa el tiempo, la actividad de la enzima disminuye hasta un 40%¹⁸³.

La enzima depende del extensor de cadena, es decir, la ureasa ataca los enlaces urea y la tripsina ataca los enlaces de lisina y arginina, así como el segmento rígido de los poliuretanos mediante ataque oxidativo. Sin embargo es bien sabido, que el ataque enzimático mediante hidrólisis ocurre en los enlaces urea y uretano localizado en la interface entre el segmento flexible y el segmento rígido, ya que estos enlaces son más accesibles. La incisión entre estas dos regiones reduce las propiedades mecánicas y baja la fuerza física de poliuretano-ureas^{171,175}.

De acuerdo al mecanismo de reacción propuesto y con en base los resultados de las enzimas ureasa y tripsina se determinó que el mecanismo de la cinética de la hidrólisis puede ser de primer orden debido a una asociación rápida de la enzima (E) con el sustrato (S) para formar el complejo enzima-sustrato (ES) el cual posteriormente se convierte en productos y enzima^{131,130}.



Por lo tanto el mecanismo de degradación pudiera ser por erosión ya que hay pérdida de masa homogénea, pero no existe cambios en la estructura química. El ataque enzimático puede ser limitado por la superficie y la morfología que es modulado por el segmento flexible. Aumentando la hidrofobicidad del polímero y reduciendo la cristalinidad causando una degradación mayor de erosión debido a hidrólisis pasiva¹⁷¹.

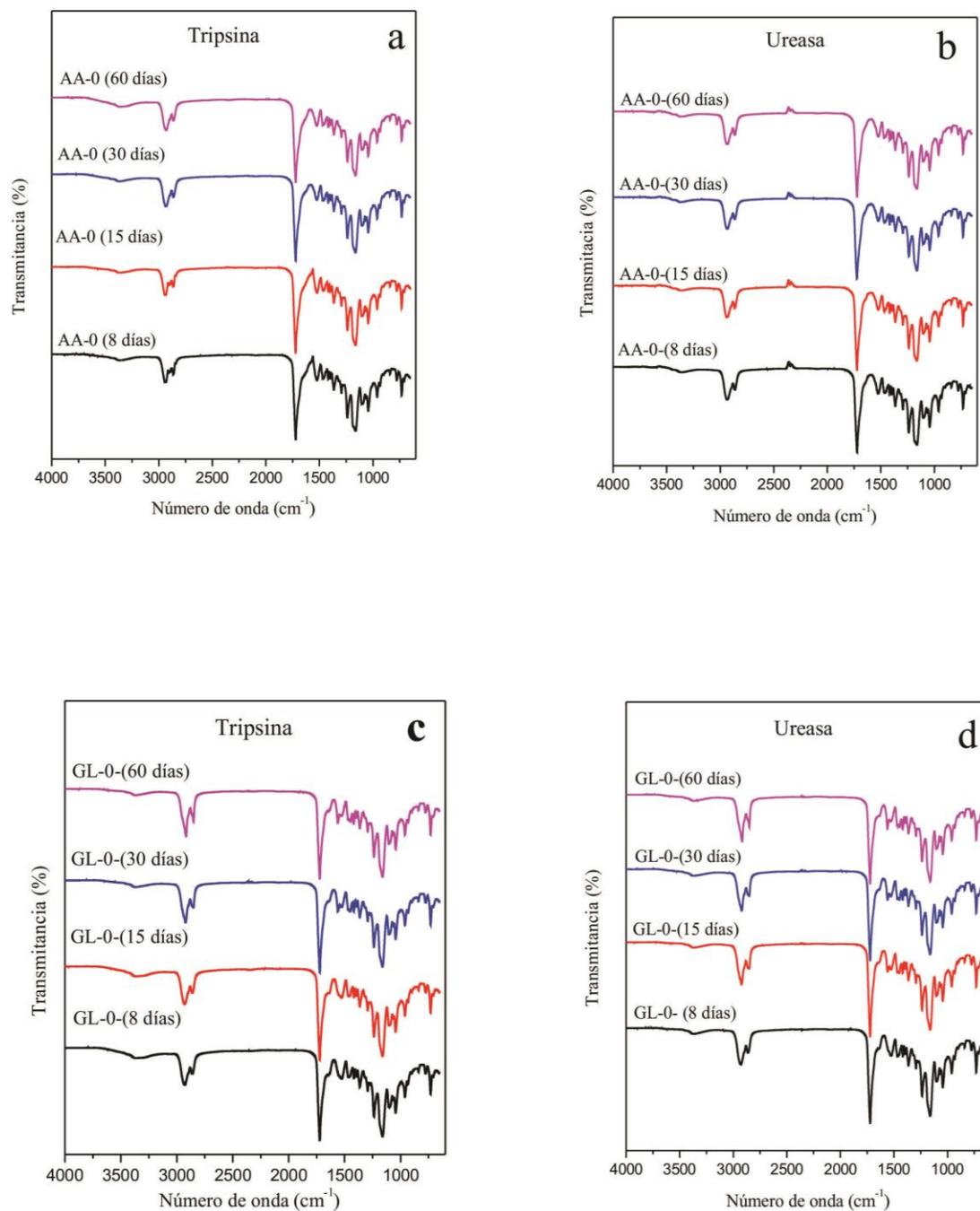


Figura 3. 14 Espectros de infrarrojo de AA-0 y GL-0 sometidos a degradaciones con tripsina y ureasa

3.6.3.3. Peso molecular de los productos de degradación enzimática

Mediante GPC se pudo estimar el efecto de las enzimas (urea y tripsina) en el peso molecular y esta variación se reporta en la Tabla 3.8. Es claro que las enzimas tienen un mayor efecto sobre los poliuretanos preparados con glutamina que cuando se usa ácido ascórbico como extensor de cadena; el peso molecular del poliéster segmentado tiene gran influencia sobre la degradación, debido a que el ácido ascórbico es muy inestable y provoca degradaciones oxidativas^{119,110}

Por otro lado, la estructura química, la hidrofobicidad, área de contacto en la superficie y grado de cristalinidad son factores importantes que afectan la degradación de los poliuretanos. Por ejemplo, la concentración de las enzimas es un factor determinante en velocidad de reacción¹⁸⁴. Otro factor que influye en la magnitud de degradaciones siendo una variable alta es el segmento flexible y el peso molecular⁶³.

El control en la degradación es importante ya que una baja tasa de degradación podría incrementar el riesgo de una respuesta inflamatoria; sin embargo una ventaja de estos materiales es que pueden ser fabricados como estructuras micro porosas para acelerar la degradación in vivo⁸⁰. Griessel et al.¹⁷⁵ reportó que la relación entre la superficie química, cambios conformacionales y degradación afecta la absorción de proteínas y crecimiento de células en el tejido⁸.

Tabla 3. 8 Variación del peso molecular de los AA-0 y GL-0 después de la degradación enzimática

SPU	M _n	M _w	M _w /M _n
AA-0	28,885	53,679	1.85
AA-0 urea (15 días)	25,106	50,609	1.71
AA 0 tripsina (15 días)	26,669	52,958	1.72
GL-0	75,490	153,540	2.03
GL-0 urea (15 días)	68,768	152,200	2.27
GL-0 Tripsina (15 días)	45,240	153,235	3.69

3.7. Biocompatibilidad

En los estudios de citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares, se emplean diferentes métodos de tinción celular con el fin de estimar de manera indirecta el número de células viables presentes después de un tratamiento. La mayoría son de punto final al usarse de forma destructiva, lo cual imposibilita seguir el comportamiento de las células después de ser sometidas a un tratamiento traumático¹¹⁸. Una prueba *in vitro* ideal para evaluar la proliferación celular y la citotoxicidad debe tener como características principales ser simple, rápida, eficiente, reproducible y segura.

La viabilidad de las células y la proliferación fueron evaluadas usando ensayos de MTT medidas por la función metabólica de las células vía actividad mitocondrial.

3.7.1. Ensayo de MTT

La viabilidad de las células de los SPU AA-0, AA-I-20% y GL-0, GL-I-20% a 24 h, en extractos expuestos a 24 h y 72 h, mostró poca diferencia en comparación con los controles negativos (solo células) todas mostraron niveles relativamente similares de actividad mitocondrial (figura 3.15). Solo los lixiviados de GL-0 a 24 h causaron una disminución de la viabilidad celular (menos del 80%) cuando se expone por un período de 72 h. Los lixiaviados de 48 h de AA-0 expuestos por 24 h y 72 h así como los lixiviados de 48 h de GL-0 expuestos durante 72 h muestran alta toxicidad. Sin embargo cabe señalar que cuando se incorporó 20% en peso de la hidroxiapatita durante la formación del pre polímero, se recuperó la viabilidad de osteoblastos (de 60% hasta 80%).

La citotoxicidad se redujo en los materiales compuestos de los poliuretanos, especialmente los que contienen ácido ascórbico como extensor de cadena tal como se observa a partir de los resultados de MTT. Por lo tanto, parece ser este compuesto osteogénico (ácido ascórbico) aún cuando se usó en cantidades más altas durante la síntesis (aproximadamente 3% en peso) que el recomendado para el cultivo celular de osteoblastos (50 mg/ml o 150 mg/l)¹⁸⁵, es más importante que la presencia de un osteoconductor (HA). Concentraciones bajas de ácido ascórbico o L- ascorbato son necesarios para la expresión de los marcadores osteoblásticos (síntesis de colágeno y la actividad de la fosfatasa alcalina) así como la mineralización^{185,186}.

Materiales compuestos preparados con ácido ascórbico durante la formación del prepolímero AA-I 20% son buenos candidatos para la regeneración del tejido óseo como lixiviados de 24 h para las cuales las células se expusieron durante 24 h no fueron tóxicas para osteoblastos humanos alveolares y permitió su proliferación hasta 14 días.

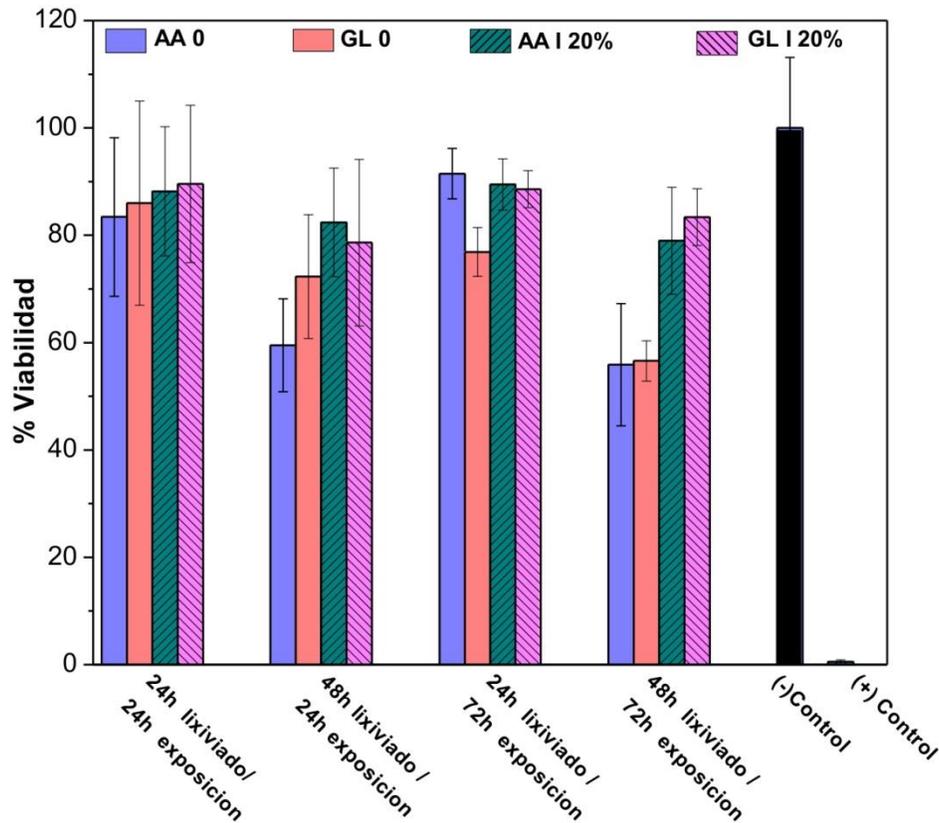


Figura 3. 15 Viabilidad de células osteoblásticas de extractos de SPU's por ensayos de MTT

3.7.2. Alamar Blue

La figura 3.16 muestra que la proliferación celular se mantuvo hasta 14 días para SPAA-0 aunque fue mayor en el día 3 y luego disminuyó. Cuando se añadió HA durante la formación del pre polímero (AA-I-20%), sin embargo, se redujo la proliferación en todos los tiempos. Para GL y GL-I-20% la proliferación celular fue menos de 20%, siendo el más bajo de todas las condiciones estudiadas. Los procesos de extracción/lixiviación son útiles para simular

condiciones clínicas y evaluar la presencia y liberación de productos tóxicos lixiviales sin afectar las propiedades químicas y mecánicas. Residuos de reacción tales como monómeros, catalizadores, disolventes o aditivos, pudieran estar presentes en cantidades suficientes como para afectar el metabolismo de las células.

La proliferación celular, aunque menos del 80% fue mayor en los poliuretanos que contienen ácido ascórbico, seguidos de aquellos materiales compuestos con hidroxiapatita preparados *in situ*. Por lo tanto, parece ser que este compuesto osteogénico es más importante la presencia de un osteoconductor. Sin embargo, a pH fisiológico está en la forma de ascorbato que es bastante inestable (se oxida fácilmente a deshidro ascorbato), por lo tanto, es posible que una liberación continua de los poliuretanos fuera beneficioso. Los poliuretanos que contienen glutamina mostraron proliferación celular pobres debido a la presencia de un nitrógeno no alcalino, como una amida que es grupo funcional de la cadena lateral. Se ha reportado que una mejor respuesta de las células se consigue por la presencia de átomos de nitrógeno alcalinos en la cadena lateral, es decir usando arginina como extensor de cadena. Además la concentración de L glutamina se encuentra en los medios de cultivo en intervalos de 2 a 4 mM, que también es inferior a la cantidad utilizada en este estudio^{186,99}. Además, L glutamina puede ser degradada a amoníaco con el tiempo y la temperatura (a partir de 8 mm hasta 3 mM después de 7 días a 37°C) lo que explica la proliferación celular pobre.

Teniendo todo esto en cuenta, se recomienda la reducción de las concentraciones de ambos compuestos osteogénicos y estudios con respecto a su liberación para la síntesis de poliuretanos futuros y su uso potencial en la regeneración de tejido óseo.

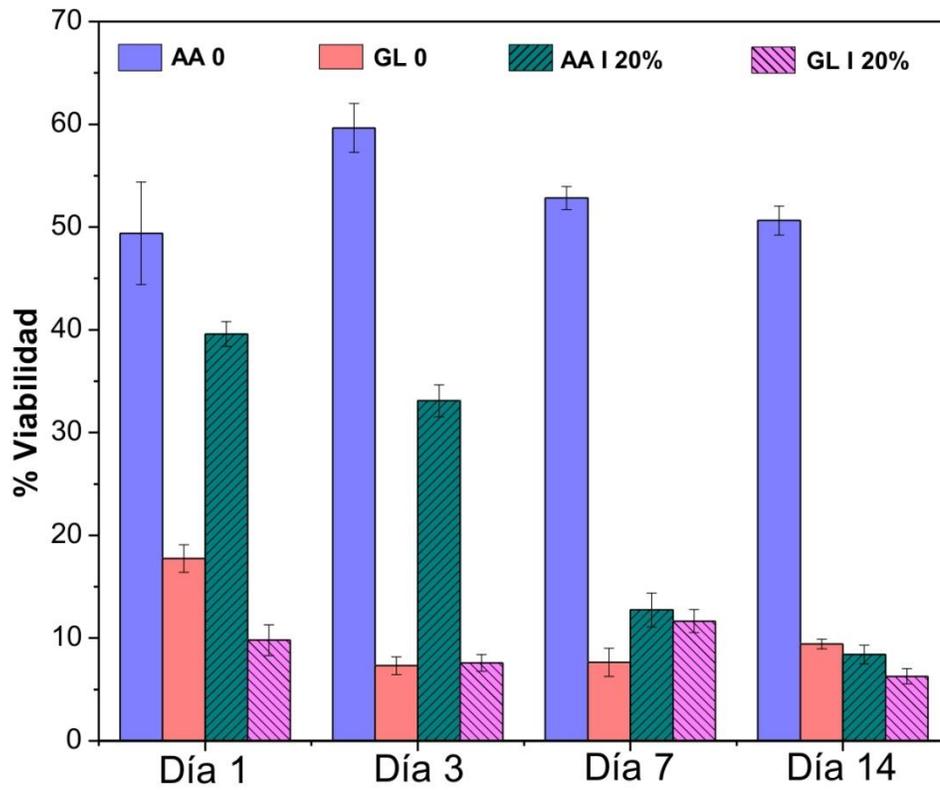


Figura 3. 16 Viabilidad de células osteoblásticas de SPU AA-0, AA-I-20% GL-0 y GL-I-20% por Alamar Blue.

Conclusiones

Fueron sintetizados exitosamente los SPU's con ácido ascórbico y glutamina como extensores de cadena. Del mismo modo, se demostró la viabilidad de incorporar HA a concentraciones de 10,15 y 20% tanto *in situ* como por mezclado.

Los espectros de FTIR de los SPU/HA mostraron la formación de enlaces uretanos y urea, así como las absorciones correspondientes a la HA incorporada dentro de esta matriz polimérica. La presencia de la HA fue observada alrededor de 1099 a 706 cm^{-1} .

La presencia de un segmento flexible cristalino correspondiente a la PCL, observado mediante DSC ($T_m=51$ y 52°C) y DRX ($2\theta=21.3^\circ$ y 2.4°) confirma la obtención de un poliuretano segmentado semicristalinos. Del mismo modo, la incorporación de la HA en SPU/HA fue verificada mediante difracción de rayos X ($2\theta= 25.9^\circ, 31.9^\circ, 33.0^\circ$ y 34.2°).

En el DMA se aprecia la presencia de una transición (T_g) que tiene un máximo en -40°C atribuida a la región amorfa de la PCL, confirmando la naturaleza segmentada de materiales compuestos SPU/HA, observada principalmente cuando la incorporación de la HA se hace *in situ*.

Mediante TGA se aprecia la temperatura de descomposición de los materiales compuestos SPU/HA en el intervalo de 397 a 494 $^\circ\text{C}$. Esta temperatura corresponde principalmente a la descomposición de la PCL aunque la descomposición del segmento rígido también se observó a aproximadamente 497 a 569 $^\circ\text{C}$.

El comportamiento mecánico de los SPU/HA *in situ* es típico de poliuretanos segmentados con carácter elastomérico ya que exhibieron deformaciones elevadas (1691.50 % vs. 1684.37% dependiendo del extensor utilizado). El módulo y la resistencia a la tensión fueron igualmente aceptables en SPU/HA *in situ*. En cuanto a los SPU/HA obtenidos mediante mezcla, las deformaciones fueron menores.

En general, se observaron pesos moleculares mayores cuando se usó glutamina como extensor y en ambos casos, la polidispersidad fue baja. Sin embargo, el efecto de la adición de HA en el peso molecular durante la etapa de extensión no fue claro.

Los estudios en PBS mostraron una pérdida de masa baja, así como una menor absorción de agua hasta por 120 días. Sin embargo, la pérdida de masa puede acelerarse bajo condiciones de pH alto o bajo o incluso en medios oxidantes.

Las micrografías del SEM mostraron una mejor dispersión de la HA en los SPU/HA *in situ* comparado con la incorporación de la HA posterior a la síntesis del SPU.

Materiales compuestos preparados con ácido ascórbico durante la formación del prepolímero AA-I 20% son buenos candidatos para la regeneración del tejido óseo ya que lixiviados de 24 h los cuales se expusieron durante 24 h no fueron tóxicos para osteoblastos humanos alveolares y permitió su proliferación hasta 14 días.

Perspectivas

En vista de las buenas propiedades fisicoquímicas de los polímeros sintetizados, se recomienda la preparación de diferentes formulaciones de poliuretanos y materiales compuestos modificando la proporción de L-glutamina o del ácido ascórbico. Asimismo, se recomienda evaluar el efecto de la concentración de estos extensores de cadena en las propiedades mecánicas y biológicas de andamios preparados con estos poliuretanos con estructura tanto lisa como porosa.

Estudiar la degradación *in vitro* de andamios a base de L-glutamina, en condiciones hidrolíticas, oxidativas y enzimáticas o simulando las condiciones fisiológicas y analizando los productos de degradación para entender su bajo desempeño.

Preparar andamios y películas a partir de las diferentes formulaciones y estudiar sus propiedades mecánicas, así como la degradación y biocompatibilidad *in vivo* de aquellos con mejores propiedades mecánicas y biológicas.

Anexos

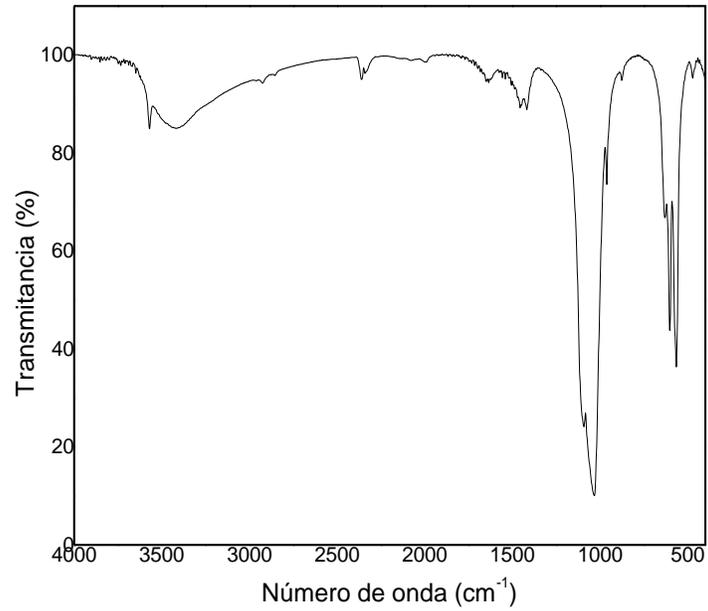


Figura A. 1 .Espectro de Infrarrojo de la hidroxiapatita pura

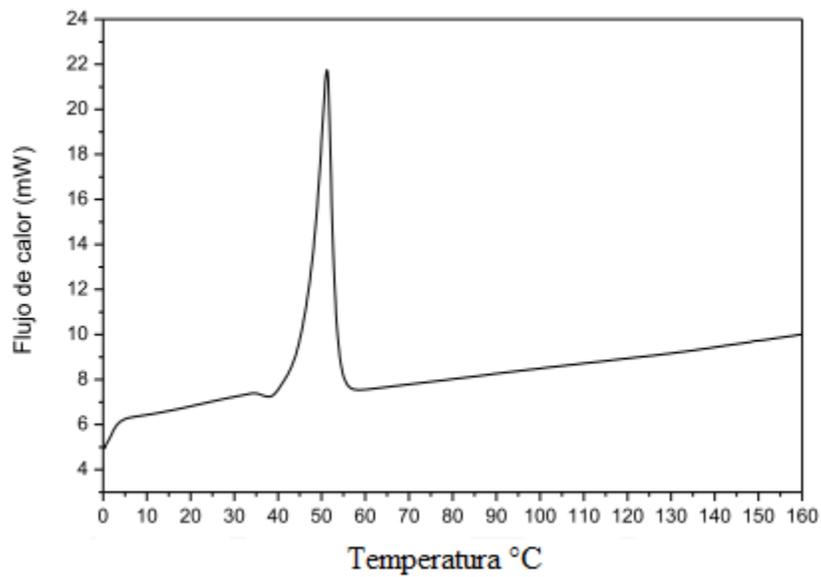


Figura A. 2 Termograma de la PCL.

Temperatura de fusión 51.1 °C

$\Delta H = 80.05 \text{ J/g}$

Porcentaje de cristalinidad 58.8 %

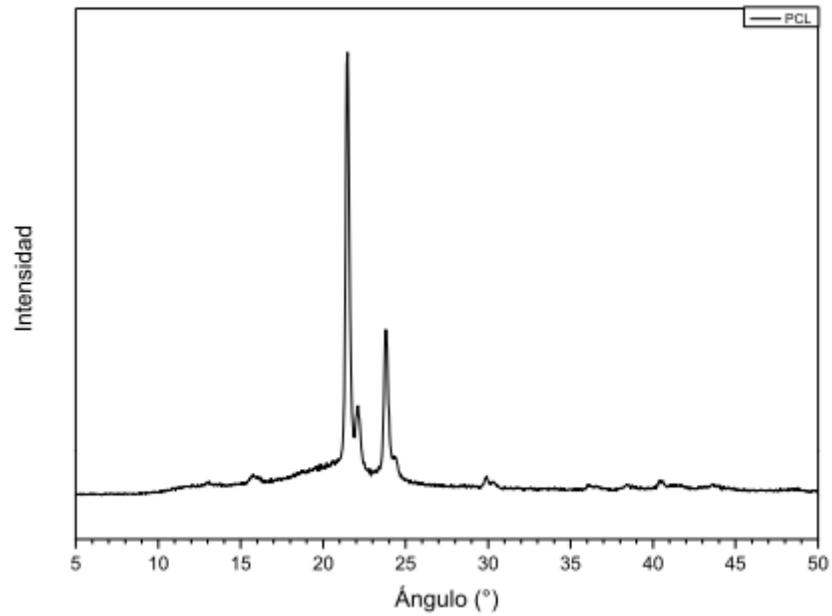


Figura A. 3.-Difractograma de Rayos X de policaprolactona pura (Aldrich)

Picos 21.28, 22.12 y 23.8 (2θ)

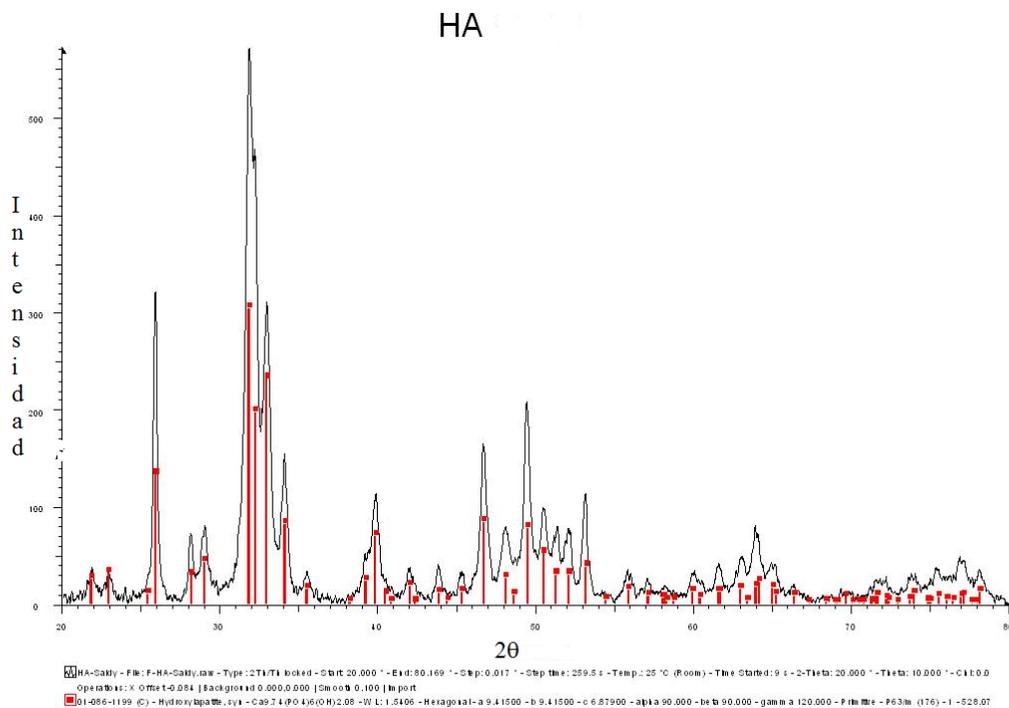


Figura A. 4 Difractograma de Rayos X de la hidroxiapatita

Tabla A. 1 Propiedades térmicas de los poliuretanos

SPU's	% de segmentos		DSC ^a		DMA ^b	TGA ^c
	% SS	% SR	T _m (°C)	% X _c	T _g (°C)	T _d (°C)
PCL 2000			50.3	40		
AA 0	75.16	23.84	50.3	38	-25.23	396.2
AA-I-10%	74.74	26,26	51.0	39	-39.87	442.9
AA-I-15%	76.50	23.50	51.6	40	-38-70	439.3
AA-I-20%	75.88	24.12	53.7	41	-38.26	427.6
AA-M-10%	75.16	23.84	50.8	32	-27.00	434.4
AA-M-15%	75.16	23.84	50-8	31	-25.32	433.7
AA-M-20%	75.16	23.84	50.3	31	-23.00	417.7
GI-0	76.12	23.88	51.4	40	-24.07	397.2
GL-I-10%	75.82	24.18	52.0	36	-30.15	401.6
GL-I-15%	76.60	23.40	50.2	37	-37.68	440.7
GL-I-20%	75.78	24.22	50.6	41	-22.36	432.8
GL-M-10%	76.12	23.88	50.6	36	-25.63	441.1
GL-M-15%	76.12	23.88	50.6	39	-31-36	435.8
GL-M-20%	76.12	23.88	51.4	39	-38.10	412.0

^a Dsc Obtenido por la primera corrida

^b Temperatura máxima determinada por α obtenida por DMA

^c Temperatura máxima de descomposición por TGA

BIBLIOGRAFIA

1. T. R. Cuadrado; M. F. González; G. A. Abraham, in *Anales de la Real Sociedad Española de Química*. (Real Sociedad Española de Química, 2001), pp. 22-33.
2. M. A. Lizarbe, Sustitutivos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular. *Rev. Real Acad. Cienc. Exactas, Físicas y Naturales (España)* **101**, 227 (2007).
3. V. R. a. L. M., La evolución del campo de los biomateriales. *Journal of applied Biomaterials* **6**, 137 (1996).
4. I. B. L. a. L. O. R. L. Reis, in *Biomateriales* a. a. J. S. R. J. Sastre R S, Ed. (CYTED, España, 2004), pp. 307-322.
5. J. Pyun; K. Matyjaszewski, Synthesis of nanocomposite organic/inorganic hybrid materials using controlled/“living” radical polymerization. *Chemistry of Materials* **13**, 3436 (2001).
6. S. R. Paital; N. B. Dahotre, Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies. *Materials Science and Engineering: R: Reports* **66**, 1 (2009).
7. G. R. Marois Y. , in *Biomedical Aplications of polyurethanes* G. H. J. Vermette Patrick, Laroche Gaétan y Guidoin Robert, Ed. (texas, Usa, 2001), pp. 77- 89.
8. H. J. Griesser, in *Biomedical Aplications of polyurethanes* L. S. Vermete P., Grisser H.J., Ed. (Texas, USA, 2001), pp. 160 - 170.
9. M. F. J.; S. R. J., en *Biomateriales*, A. a. J. S. R. J. Sastre R S, Ed. (España, 2004), pp. 17-26, .

10. S. R. J., en *Biomateriales*, a. a. J. S. R. J. Sastre R S, Ed. (Cyted, España, 2004), pp. 219-238.
11. A. J. Salgado; O. P. Coutinho; R. L. Reis, Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular bioscience* **4**, 743 (2004).
12. K. J. Burg; S. Porter; J. F. Kellam, Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* **21**, 2347 (2000).
13. M. I. Lopretti Correa; A. Gandini, Nuevos materiales poliméricos derivados de fuentes renovables. *INNOTEC*, 59 (2013).
14. M. a. C. P. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil L. Alobera Gracia, M. ,Blanco Jerez, L., Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)* **11**, 47 (2006).
15. G. L. R. Gil Albarova J, Gil Albarova R, Melgosa, Gil M, Materials for bone healing and substitution growth factors and gene therapy in ortopedic and traumatology. *Mapre medicina* **14**, (2003).
16. T. K. N. K. Itoh S.; Kikuchi M., Koyama, Y., Tanaka, J., Shinomiya K., Implantation study of a novel hydroxyapatite/collagen (HAp/col) composite into weight-bearing sites of dogs. *Journal of biomedical materials research* **63**, 507 (2002).
17. M. R. Cobos; J. H. Ricardo; E. H. Samper; L. M. Camargo, Cicatrización y regeneración ósea de los maxilares después de una quistectomía: reporte de un caso y revisión de la literatura. *Universitas Odontológica* **30**, 71 (2011).
18. N. K. Lee; H. Sowa; E. Hinoi; M. Ferron; J. D. Ahn; C. Confavreux; R. Dacquin; P. J. Mee; M. D. Mckee; D. Y. Jung, Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* **130**, 456 (2007).

19. A. Asefnejad; A. Behnamghader; M. T. Khorasani; B. Farsadzadeh, Polyurethane/fluor-hydroxyapatite nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. Part I: morphological, physical, and mechanical characterization. *International journal of nanomedicine* **6**, 93 (2011).
20. W. Xu; X. Liao; B. Li; T. Li, in *Bioelectronics and Bioinformatics (ISBB), 2011 International Symposium on.* (IEEE, 2011), pp. 224-227.
21. D. G. F. Falke, Atala A., Reconstrucción de tejidos y organs utilizando ingeniería tisular *Reconstrucción* **98**, 103 (2000).
22. C. Rey; C. Combes; C. Drouet; M. J. Glimcher, Bone mineral: update on chemical composition and structure. *Osteoporosis international* **20**, 1013 (2009).
23. E. Barba, Marcadores de remodelado óseo y osteoporosis. *Revista Mexicana Patalogico clinico* **58**, 113 (2011).
24. I. a. G. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, M.A.; Canto Pingarrón, M.; Blanco Jerez, L., Bases fisiológicas de la regeneración ósea II: El proceso de remodelado. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)* **11**, 151 (2006).
25. E. [Www.Midlandstech](http://www.Midlandstech), Bones and skeletal tissues, Revisado el 7 agosto 2013.
26. [Www.Slideshare.Net/Cbqma](http://www.Slideshare.Net/Cbqma), Red de salud. 4 (2013).
27. J. F. Cueva-Del Castillo; G. A. Valdés-Gutiérrez; F. Elizondo-Vázquez; O. Pérez-Ortiz; M. C. P. Barba; León-Mancilla; B. H. , Tratamiento de pérdidas óseas, pseudoartrosis, artrodesis y tumores óseos benignos con un xenoimplante mexicano (estudio clínico). *Cir Ciruj* **77**, 287 (2009).
28. J. F. C. Del Castillo; J. F. Osuna; F. Elizondo; O. Pérez; A. Pérez; S. Hernández; C. Mejía, Aplicación de xenoimplante para el tratamiento de defectos óseos, tumores

- benignos, pseudoartrosis y artrodesis.(Reporte preliminar). *Acta Ortopédica Mexicana* **21**, 31 (2007).
29. F. P, Periodontitis, Revisado el www.nlm.nih.gov/medlplus
30. H. Collado, Artrosis. (2013).
31. Q. A., Tumor de hueso, Revisado el 11 de julio 2013. www.nlm.nih.gov/medlmeplus/spansh
32. J. G. Albarova; R. G. Lahiguera;R. G. Albarova, Estado actual de los injertos óseos. Biología, función, conservación, riesgo de transmisión de enfermedades, inmunogenicidad e incorporación. *Revista española de cirugía osteoarticular* **36**, 23 (2001).
33. R. D. Levesque S., Vermette P., Gunatillake P.A., in *Biomedical Applications of Polyurethanes* L. S. Vermete P., Grisser H..J., Ed. (Texas Usa, Quebec, 2001), pp. 22-48.
34. J. De Pedro Moro, Estudio de la regeneración ósea mediante la implantación endomedular de biomateriales Study of bone regeneration by endomedullar implantation of biomaterials. *PATOLOGÍA DEL APARATO LOCOMOTOR* **3**, 24 (2005).
35. G. A. Pagliai Regeneración ósea guiada. *Diplôme D`Université D`Implantologie Orale et Maxillo-Faciale*, 22 (2001).
36. C. W. Chou; S. H. Hsu;P. H. Wang, Biostability and biocompatibility of poly (ether) urethane containing gold or silver nanoparticles in a porcine model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **84**, 785 (2008).

37. B. Zárate-Kalfópulos;A. Reyes-Sánchez, Injertos óseos en cirugía ortopédica. *Cirugía y Cirujanos* **74**, 217 (2006).
38. M. San Julián;A. Valenti, in *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. (SciELO Espana, 2006), vol. 29, pp. 125-136.
39. A. Dib-Kuri; S. Aburto-Morales; A. Espinosa-Álvarez;O. Sánchez-Ramírez, Trasplantes de órganos y tejidos en México. *Revista de investigación clínica* **57**, 163 (2005).
40. N. Cuende; J. Cañón; M. Alonso; C. Martín; E. Sagredo;B. Miranda, Programa de garantía de calidad en el proceso de donación y trasplante de la Organización Nacional de Trasplantes. *Nefrología* **21**, 65 (2001).
41. M. a. N. P. C. R. Piña Barba María Cristina, Lima Enrique, Caracterización de hueso bovino anorgánico: Nukbone. *Acta Ortopédica Mexicana* **20**, 150 (2006).
42. J. Gil Albarova; R. Garrido Lahiguera;R. Gil Albarova, Estado actual de los injertos óseos: Biología, función, conservación, riesgo de transmisión de enfermedades, inmunogenicidad e incorporación. *Revista española de cirugía osteoarticular* **36**, 23 (2001).
43. A. Echavarría; F. De La Calle;M. E. Londoño, Características cristaloquímicas de la hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas. *Revista EIA*, 109 (2006).
44. A. Abarca; G. Naser;J. Pardo, Aplicaciones de materiales aloplásticos en rinoplastía. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello* **70**, 259 (2010).
45. T. L. D. L. Bargiela Pérez P., Jutierrez Perez J.L, in *Sociedad Española de Cirugía Bucal* T. L. D. l. Bargiela Pérez P., Jutierrez Perez J.L, Ed. (Universidad de Sevilla, España, 2009), vol. 4, pp. 1-8.

46. E. Jimi; S. Hirata; K. Osawa; M. Terashita; C. Kitamura; H. Fukushima, The current and future therapies of bone regeneration to repair bone defects. *International journal of dentistry* **2012**, (2012).
47. G. a. G. Garcia Cordona A., Mejia O., Osteobiología: aspectos novedosos del tejido óseo y la terapéutica con el plasma rico en plaquetas. *Med UNAB* **10**, 212 (2007).
48. F. G.-. www.Kasios.Com, Regeneración ósea, Revisado el (2010)
49. C. P. Estrada, A. N, López, L.E., Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas. *Revista EIA* **5**, 93 (2006).
50. S. L. C, “ La ciencia al alcance de la mano” (Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (CSIC) 2011).
51. D. W. Hutmacher, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* **21**, 2529 (2000).
52. L. Zhou; L. Yu; M. Ding; J. Li; H. Tan; Z. Wang; Q. Fu, Synthesis and characterization of pH-sensitive biodegradable polyurethane for potential drug delivery applications. *Macromolecules* **44**, 857 (2011).
53. L. Di Silvio, Scaffold, Ed. (King's Collage London, 2010).
54. D. Puppi; F. Chiellini; A. Piras; E. Chiellini, Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science* **35**, 403 (2010).
55. K. Rezwan; Q. Chen; J. Blaker; A. R. Boccaccini, Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **27**, 3413 (2006).

-
56. J. Santerre; K. Woodhouse; G. Laroche; R. Labow, Understanding the biodegradation of polyurethanes: from classical implants to tissue engineering materials. *Biomaterials* **26**, 7457 (2005).
 57. G. S., Selected topics in biomedical polyurethanes. A review. *Colloid & Polymer Science* **267**, 757 (1989).
 58. P. A. Gunatillake; R. Adhikari, Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater* **5**, 1 (2003).
 59. E. H. A. I Rehman, R Smith, *In vitro degradation of poly (ester- Urethanes) for biomedical applications*. Journal of Materials Science; Materials in medicine, 1996.
 60. Z. S. Petrović; Z. Zavargo; J. H. Flynn; W. J. Macknight, Thermal degradation of segmented polyurethanes. *Journal of Applied Polymer Science* **51**, 1087 (1994).
 61. K. Ang; K. Leong; C. Chua; M. Chandrasekaran, Compressive properties and degradability of poly (ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite composites under accelerated hydrolytic degradation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **80**, 655 (2007).
 62. S. I. A. Razak; N. F. A. Sharif; W. a. W. A. Rahman, Biodegradable Polymers and their Bone Applications: A Review.
 63. N. Yamamoto; A. Nakayama; M. Oshima; N. Kawasaki; S. Aiba, Enzymatic hydrolysis of lysine diisocyanate based polyurethanes and segmented polyurethane ureas by various proteases. *Reactive and Functional Polymers* **67**, 1338 (2007).
 64. C.-H. Tsou; H.-T. Lee; H.-A. Tsai; H.-J. Cheng; M.-C. Suen, Synthesis and properties of biodegradable polycaprolactone/polyurethanes by using 2, 6-pyridinedimethanol as a chain extender. *Polymer Degradation and Stability*, (2012).
-

-
65. L. May-Hernández; F. Hernández-Sánchez; J. Gomez-Ribelles; S. I. Serra, Segmented poly (urethane-urea) elastomers based on polycaprolactone: Structure and properties. *Journal of Applied Polymer Science* **119**, 2093 (2011).
 66. S. S. Umare; A. S. Chandure, Synthesis, characterization and biodegradation studies of poly (ester urethane) s. *Chemical Engineering Journal* **142**, 65 (2008).
 67. S. R. J., in *Proceso de degradación de polimeros*. (Departamento de Biomateriales. Instituto de polimeros, 2010).
 68. P. P. J. Delebecq E, Boutevin B, Ganachaud F, On the Versatility of Urethane/Urea Bonds: Reversibility, Blocked Isocyanate, and Non-isocyanate Polyurethane. *Chemical Reviews* **113**, 80 (2013).
 69. Z. Dong; Y. Li; Q. Zou, Degradation and biocompatibility of porous nano-hydroxyapatite/polyurethane composite scaffold for bone tissue engineering. *Applied Surface Science* **255**, 6087 (2009).
 70. J. Jagur-Grodzinski, Polymers for tissue engineering, medical devices, and regenerative medicine. Concise general review of recent studies. *Polymers for Advanced Technologies* **17**, 395 (2006).
 71. S. A. Guelcher; K. M. Gallagher; J. E. Didier; D. B. Klindinst; J. S. Doctor; A. S. Goldstein; G. L. Wilkes; E. J. Beckman; J. O. Hollinger, Synthesis of biocompatible segmented polyurethanes from aliphatic diisocyanates and diurea diol chain extenders. *Acta Biomaterialia* **1**, 471 (2005).
 72. K. D. Kavlock; T. W. Pechar; J. O. Hollinger; S. A. Guelcher; A. S. Goldstein, Synthesis and characterization of segmented poly (esterurethane urea) elastomers for bone tissue engineering. *Acta biomaterialia* **3**, 475 (2007).

-
73. K. Gorna;S. Gogolewski, Biodegradable polyurethanes for implants. II. In vitro degradation and calcification of materials from poly (ϵ -caprolactone)–poly (ethylene oxide) diols and various chain extenders. *Journal of biomedical materials research* **60**, 592 (2002).
 74. S. G. M. M. Albors A., Garcia W, La síntesis de poliuretanos a partir de isocianatos alifáticos no tóxicos y polioles creados por triglicéridos insaturados mediante azonolisis. (2009).
 75. S. Gogolewski, Selected topics in biomedical polyurethanes. A review. *Colloid and Polymer Science* **267**, 757 (1989).
 76. J. Han; B. Chen; L. Ye; A.-Y. Zhang; J. Zhang;Z.-G. Feng, Synthesis and characterization of biodegradable polyurethane based on poly (ϵ -caprolactone) and L-lysine ethyl ester diisocyanate. *Frontiers of Materials Science in China* **3**, 25 (2009).
 77. E. M. Maafi; F. Malek;L. Tighzert, Synthesis and characterization of new polyurethane based on polycaprolactone. *Journal of Applied Polymer Science* **115**, 3651 (2010).
 78. J. Guan; M. S. Sacks; E. J. Beckman;W. R. Wagner, Synthesis, characterization, and cytocompatibility of elastomeric, biodegradable poly (éster-urethane) ureas based on poly (caprolactone) and putrescine. *Journal of biomedical materials research* **61**, 493 (2002).
 79. J. M. Williams; A. Adewunmi; R. M. Schek; C. L. Flanagan; P. H. Krebsbach; S. E. Feinberg; S. J. Hollister;S. Das, Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials* **26**, 4817 (2005).
-

-
80. K. J. T. Castoguy M, Zang Z. Laroche G., in *Biomedical Applications of Polyurethanes* G. H. J. Vermette Patrick, Laroche Gaétan y Guidoin Robert, Ed. (Landes Biosciencie, Texas, USA, 2001), pp. 1-19.
 81. G. A. Abraham; A. Marcos-Fernández; J. S. Román, Bioresorbable poly (ester-ether urethane) s from L-lysine diisocyanate and triblock copolymers with different hydrophilic character. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **76**, 729 (2006).
 82. G. Skarja; K. Woodhouse, Structure-property relationships of degradable polyurethane elastomers containing an amino acid-based chain extender. *Journal of Applied Polymer Science* **75**, 1522 (2000).
 83. 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 of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **44**, 2990 (2006).
 84. J. H. Hong; H. J. Jeon; J. H. Yoo; W.-R. Yu; J. H. Youk, Synthesis and characterization of biodegradable poly (ϵ -caprolactone- co- β -butyrolactone)-based polyurethane. *Polymer degradation and stability* **92**, 1186 (2007).
 85. 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 of Biomedical Materials Research Part A* **80A**, 655 (2007).
 86. P. Ping; W. Wang; X. Chen; X. Jing, Poly (ϵ -caprolactone) polyurethane and its shape-memory property. *Biomacromolecules* **6**, 587 (2005).
 87. A. Marcos-Fernández; G. A. Abraham; J. Valentín; J. S. Román, Synthesis and characterization of biodegradable non-toxic poly (ester-urethane-urea) s based on poly (ϵ -caprolactone) and amino acid derivatives. *Polymer* **47**, 785 (2006).
-

-
88. P. S. G. S. Goena K, Synthesis and Characterization of Biodegradable Poly(ϵ -caprolactoneurethane)s. I. Effect of the Polyol Molecular Weight, Catalyst, and Chain Extender on the Molecular Weight, Catalyst, and Chain Extender on the. *Polymer Science Part A Polymer Chemistry* **40**, 156 (2002).
 89. W. W. Peng Ping, Xuesi Chen, and Xiabin Jing*, Poly(ϵ -caprolactone) Polyurethane and Its Shape-Memory Property. *Macromolecular bioscience* **6**, 587 (2005).
 90. M. Semsarzadeh; A. Navarchian, Effects of NCO/OH ratio and catalyst concentration on structure, thermal stability, and crosslink density of poly (urethane-isocyanurate). *Journal of applied polymer science* **90**, 963 (2003).
 91. G. Tillet; B. Boutevin; B. Ameduri, Chemical reactions of polymer crosslinking and post-crosslinking at room and medium temperature. *Progress in Polymer Science* **36**, 191 (2011).
 92. A. S. B. a. G. A. Marcos Fernandez, Poliuretanos bioegradablrd no tóxicos para la liberación controlada de fármacos y para ingeniería de tejido. (2005).
 93. E. Delebecq; J.-P. Pascault; B. Boutevin; F. O. Ganachaud, On the Versatility of Urethane/Urea Bonds: Reversibility, Blocked Isocyanate, and Non-isocyanate Polyurethane. *Chemical reviews* **113**, 80 (2012).
 94. P. Krol, Synthesis methods, chemical structures and phase structures of linear polyurethanes. Properties and applications of linear polyurethanes in polyurethane elastomers, copolymers and ionomers. *Progress in materials science* **52**, 915 (2007).
 95. J. A. Bernstein, Overview of diisocyanate occupational asthma. *Toxicology* **111**, 181 (1996).

-
96. K. L. P., Synthesis methods, chemical structures and phase structures of linear polyurethanes. Properties and applications of linear polyurethanes in polyurethane elastomers, copolymers and ionomers. *Progress in Materials Science* **52**, 915 (2006).
 97. L. Chan-Chan; A. Perales-Alcacio; R. V. Coronado; J. Cervantes-Uc; J. Cauich-Rodríguez, Synthesis of Segmented Polyurethanes with either Glutathione or Cysteine as Chain Extenders.
 98. P. Caracciolo; A. De Queiroz; O. Higa; F. Buffa; G. Abraham, Segmented poly (esterurethane urea) s from novel urea–diol chain extenders: Synthesis, characterization and in vitro biological properties. *Acta biomaterialia* **4**, 976 (2008).
 99. J. Perales-Alcacio; J. Santa-Olalla Tapia; C. Mojica-Cardoso; R. Vargas-Coronado; L. Chan-Chan; D. Headen; A. García; J. Cervantes-Uc; J. Cauich-Rodríguez, HUVEC biocompatibility and platelet activation of segmented polyurethanes prepared with either glutathione or its amino acids as chain extenders. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 1 (2013).
 100. D. Mecke, l-Glutamine. *Determination with glutamine synthetase, Methods of Enzymatic Analysis, Academic Press, New York*, 1716 (1974).
 101. K. Ari; T. Kai; Y. Kokuba, Degradation kinetics of L-alanyl-L-glutamine and its derivatives in aqueous solution. *European journal of pharmaceutical sciences* **7**, 107 (1999).
 102. P. Newsholme, Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *The Journal of nutrition* **131**, 2515S (2001).
 103. D. L. Nelson; M. M. Cox; C. Cuchillo, *Lehninger principios de bioquímica*. Omega, 2001.
-

-
104. A. Bonet;T. Grau, La glutamina, un aminoácido casi indispensable en el enfermo crítico. *Medicina intensiva* **31**, 402 (2007).
 105. M. V. Regí, Química y bioquímica: construyendo biomateriales. (2011).
 106. S. B. Oppenheimer; M. Edidin; C. W. Orr;S. Roseman, An L-glutamine requirement for intercellular adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **63**, 1395 (1969).
 107. L. Stryer, *Bioquímica*. Universidad del Rosario, 1979.
 108. M. Taniguchi; N. Arai; K. Kohno; S. Ushio;S. Fukuda, Anti-oxidative and anti-aging activities of 2- O- α -glucopyranosyl-L-ascorbic acid on human dermal fibroblasts. *European journal of pharmacology* **674**, 126 (2012).
 109. S. C. Rumsey;M. Levine, Absorption, transport, and disposition of ascorbic acid in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **9**, 116 (1998).
 110. H. M. Serra;T. A. Cafaro, Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo. *Acta bioquímica clínica latinoamericana* **41**, 525 (2007).
 111. B. B. Tuero, Funciones de la vitamina C en el metabolismo del colágeno. *Rev Cubana Aliment Nutr* **14**, 46 (2000).
 112. G. Köse; A. Tezcaner;V. Hasırcı, Fundamentals of tissue engineering: Carrier materials and an application. *Technology and Health Care* **10**, 187 (2002).
 113. R. R. E., Recubrimientos híbridos polímero–cerámico. *Centro Universitario de Vinculación, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.* , (2010).
 114. S. C. Romero Pedro, Functional hybrid materiales. *WILEY-VCH* (2004).
-

-
115. R. R. M, ^sintesis caracterizacion y evaluacion bioactiva e hibridos base siloxano con diferentes contenidos de TIO₂ y Cao, Instituto Politecnico Naconal México D.F,(2008).
 116. P. Król, *Linear polyurethanes: synthesis methods, chemical structures, properties and applications*. CRC Press, 2008.
 117. A. D. A.R.M, ^Sistems polimericos hidroflicos con gruos ionzables y su aplicación como biomaterial, Universidad Computense de Madrid Madrid España,(2002).
 118. R. Hamid; Y. Rotshteyn; L. Rabadi; R. Parikh;P. Bullock, Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in vitro* **18**, 703 (2004).
 119. G. H. J. Vermette Patrick, Laroche Gaétan Y Guidoin Robert. (2011).
 120. L. Yuchun; L. Jing;T. Swee-Hin, Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. *Biotechnology advances*, (2012).
 121. L. S. Nair;C. T. Laurencin, Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in polymer science* **32**, 762 (2007).
 122. I. C. Bonzani; R. Adhikari; S. Houshyar; R. Mayadunne; P. Gunatillake;M. M. Stevens, Synthesis of two-component injectable polyurethanes for bone tissue engineering. *Biomaterials* **28**, 423 (2007).
 123. L. Wang; Y. Li; Y. Zuo; L. Zhang; Q. Zou; L. Cheng;H. Jiang, Porous bioactive scaffold of aliphatic polyurethane and hydroxyapatite for tissue regeneration. *Biomedical Materials* **4**, 025003 (2009).
 124. J. L. Ryszkowska; M. Auguścik; A. Sheikh;A. R. Boccaccini, Biodegradable polyurethane composite scaffolds containing Bioglass® for bone tissue engineering. *Composites Science and Technology* **70**, 1894 (2010).
-

-
125. Palma Cortes R.B.;R. C. S, La Ingeniería de Tejidos óseos. *Journal de Investigación de la Escuela de Graduados e Innovación*, 54 (2008).
 126. I. Armentano; M. Dottori; E. Fortunati; S. Mattioli;J. Kenny, Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review. *Polymer degradation and stability* **95**, 2126 (2010).
 127. P. C. R. Hernández T.R., Piña B. M. Cristina⁴⁵, Hidroxiapatita y sus aplicaciones. *Revista Mexicana de Física* **45**, 144 (1999).
 128. R. G. J. Garcia Garduño M.V., La hidroxiapatita , su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación médica. *Revista especializada en ciencias químicas y biológicas* **9**, 90 (2006).
 129. G. Wei;P. X. Ma, Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **25**, 4749 (2004).
 130. N. A. Rangel Vázquez; A. Salazar; H. E. De; J. Romero García; J. L. Rivera Armenta; A. Alvarez-Castillo; E. García-Hernández;T. Castrejón-Rosales, Estudio cinético de la hidrólisis enzimática de materiales compuestos de poliuretano poroso/hidroxiapatita. *Revista Iberoamericana de Polímeros* **9**, 25 (2008).
 131. N. A. Rangel Vázquez; A. Salazar; H. E. De; J. Romero García; E. García-Hernández;J. L. Rivera Armenta, Análisis de FTIR en la hidrólisis enzimática y modelos matemáticos de materiales compuestos de poliuretano poroso/hidroxiapatita. *Revista Iberoamericana de Polímeros* **10**, 161 (2009).
 132. C. Martinez-Pérez; A. Martinez-Villafane;J. Romero-Garcia, Formación de hidroxiapatita sobre un superficie polimérica por um método biomimético. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica* **21**, 137 (2000).
-

-
133. C. A. Martínez Pérez; P. García Casillas; A. Martínez Villafañe; J. Romero García, Preparación y caracterización de un material compuesto poli (uretano)/hidroxiapatita mediante separación de fases. *Martínez Pérez, Carlos Alberto [et al.]. Preparación y caracterización de un material compuesto poli (uretano)/hidroxiapatita mediante separación de fases. Biomecánica, 2001, vol. IX, núm. 1, p. 39-44, (2001).*
134. V. Guarino; F. Causa; P. A. Netti; G. Ciapetti; S. Pagani; D. Martini; N. Baldini; L. Ambrosio, The role of hydroxyapatite as solid signal on performance of PCL porous scaffolds for bone tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **86**, 548 (2008).
135. E. Vasile; L. Popescu; R. Piticescu; A. Burlacu; T. Buruiana, Physico-chemical and biocompatible properties of hydroxyapatite based composites prepared by an innovative synthesis route. *Materials Letters* **79**, 85 (2012).
136. L. Shor; S. Güçeri; X. Wen; M. Gandhi; W. Sun, Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions *in vitro*. *Biomaterials* **28**, 5291 (2007).
137. Y. Zhang; L. Hao; M. Savalani; R. A. Harris; L. Di Silvio; K. Tanner, In vitro biocompatibility of hydroxyapatite-reinforced polymeric composites manufactured by selective laser sintering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **91**, 1018 (2009).
138. A. Martinez-Valencia; G. Carbajal-De La Torre; R. Torres-Sanchez; L. Tellez-Jurado; H. Esparza-Ponce, Production of polyurethane/nano-hydroxyapatite hybrid materials and microstructural characterization. *Int. J. Phys. Sci* **6**, 2731 (2011).
139. A. Martínez-Valencia; G. Carbajal-De La Torre; A. D. Moller; H. Esparza-Ponce; M. Espinosa-Medina, Study of bioactivity, biodegradability and mechanical properties of polyurethane/nano-hydroxyapatite hybrid composites. *International Journal of the Physical Sciences* **6**, 6681 (2011).
-

140. R. K. Roeder; G. L. Converse; R. J. Kane; W. Yue, Hydroxyapatite-reinforced polymer biocomposites for synthetic bone substitutes. *JOM Journal of the Minerals, Metals and Materials Society* **60**, 38 (2008).
141. Y. Feng; C. Li, Study on oxidative degradation behaviors of polyesterurethane network. *Polymer degradation and stability* **91**, 1711 (2006).
142. L. Di Silvio; G. Neelam, en *Human Cell culture*. (Springer etherlands, 2002), pp. 221-241.
143. S. Deb; R. Mandegar; L. Di Silvio, A porous scaffold for bone tissue engineering/45S5 Bioglass® derived porous scaffolds for co-culturing osteoblasts and endothelial cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **21**, 893 (2010).
144. L. H. Chan Chan, Síntesis y caracterización de poliuretanos biodegradables tiolados.
145. T. Ando; Y. Zenitani; M. Oishi, Effects of NCO/OH molar ratio on the concentration of allophanate linkages in linear polyurethane formation. *Yukagaku* **43**, 225 (1994).
146. S. Jiang; X. Ji; L. An; B. Jiang, Crystallization behavior of PCL in hybrid confined environment. *Polymer* **42**, 3901 (2001).
147. J. Fernández; G. Abraham; S. Cortizo; A. Cortizo, Propiedades Biológicas de matrices porosas y no porosas de PCL y PFIP.
148. M. Wang; R. Joseph; W. Bonfield, Hydroxyapatite-polyethylene composites for bone substitution: effects of ceramic particle size and morphology. *Biomaterials* **19**, 2357 (1998).

-
149. M. A. Giardina; M. Fanovich; G. Abraham, Preparación de membranas porosas de policaprolactona/hidroxiapatita mediante electrohilado. *Asociación Argentina de Biomateriales*, 1 (2008).
 150. R. Neuendorf; E. Saiz; A. Tomsia; R. Ritchie, Adhesion between biodegradable polymers and hydroxyapatite: Relevance to synthetic bone-like materials and tissue engineering scaffolds. *Acta Biomaterialia* **4**, 1288 (2008).
 151. C. M. Hansen, Solubility parameters. *Paint Testing Manual*, 383 (1995).
 152. J. Burke, *Solubility parameters theory and application*. 1984.
 153. K. Gorna; S. Polowinski; S. Gogolewski, Synthesis and characterization of biodegradable poly (ϵ -caprolactone urethane) s. I. Effect of the polyol molecular weight, catalyst, and chain extender on the molecular and physical characteristics. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **40**, 156 (2002).
 154. L. Chan-Chan; R. Solis-Correa; R. Vargas-Coronado; J. Cervantes-Uc; J. Cauich-Rodríguez; P. Quintana; P. Bartolo-Pérez, Degradation studies on segmented polyurethanes prepared with HMDI, PCL and different chain extenders. *Acta Biomaterialia* **6**, 2035 (2010).
 155. H. Liu; L. Zhang; J. Li; Q. Zou; Y. Zuo; W. Tian; Y. Li, Physicochemical and biological properties of nano-hydroxyapatite-reinforced aliphatic polyurethanes membranes. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **21**, 1619 (2010).
 156. G. Tripathi; B. Basu, A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations. *Ceramics International* **38**, 341 (2012).
 157. N. Aboudzadeh; M. Imani; M. A. Shokrgozar; A. Khavandi; J. Javadpour; Y. Shafieyan; M. Farokhi, Fabrication and characterization of poly (D, L-lactide-co-
-

-
- glycolide)/hydroxyapatite nanocomposite scaffolds for bone tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **94**, 137 (2010).
158. C. R. Kothapalli; M. T. Shaw; M. Wei, Biodegradable HA-PLA 3-D porous scaffolds: Effect of nano-sized filler content on scaffold properties. *Acta Biomaterialia* **1**, 653 (2005).
159. P. M. G. Jódar; P. Manuel, *Mojado en condiciones de no-equilibrio sobre superficies reales*. Editorial de la Universidad de Granada, 2006.
160. Y. Arima; H. Iwata, Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials* **28**, 3074 (2007).
161. V. Guarino; P. Taddei; M. D. Foggia; C. Fagnano; G. Ciapetti; L. Ambrosio, The Influence of Hydroxyapatite Particles on In Vitro Degradation Behavior of Poly ϵ -Caprolactone-Based Composite Scaffolds. *Tissue Engineering Part A* **15**, 3655 (2009).
162. H. Liu; L. Zhang; Y. Zuo; L. Wang; D. Huang; J. Shen; P. Shi; Y. Li, Preparation and characterization of aliphatic polyurethane and hydroxyapatite composite scaffold. *Journal of Applied Polymer Science* **112**, 2968 (2009).
163. 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).
164. J. E. Báez; Á. Marcos-Fernández; R. Lebrón-Aguilar; A. Martínez-Richa, A novel route to α , ω -telechelic poly (ϵ -caprolactone) diols, precursors of biodegradable polyurethanes, using catalysis by decamolybdate anion. *Polymer* **47**, 8420 (2006).
-

-
165. C.-X. Zhao;W.-D. Zhang, Preparation of waterborne polyurethane nanocomposites: polymerization from functionalized hydroxyapatite. *European Polymer Journal* **44**, 1988 (2008).
 166. W. Cui; X. Li; C. Xie; H. Zhuang; S. Zhou;J. Weng, Hydroxyapatite nucleation and growth mechanism on electrospun fibers functionalized with different chemical groups and their combinations. *Biomaterials* **31**, 4620 (2010).
 167. M. Barikani; H. Honarkar;M. Barikani, Synthesis and characterization of polyurethane elastomers based on chitosan and poly (ϵ -caprolactone). *Journal of Applied Polymer Science* **112**, 3157 (2009).
 168. B. Chuenjitkuntaworn; W. Inrung; D. Damrongsri; K. Mekaapiruk; P. Supaphol;P. Pavasant, Polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds: preparation, characterization, and in vitro and in vivo biological responses of human primary bone cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **94**, 241 (2010).
 169. Q. Meng; J. Hu; B. Liu;Y. Zhu, A low-temperature thermoplastic anti-bacterial medical orthotic material made of shape memory polyurethane ionomer: influence of ionic group. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **20**, 199 (2009).
 170. H.-T. Lee;C.-C. Wang, Synthesis and properties of aqueous polyurethane/polytert-butylacrylate hybrid dispersions. *Journal of polymer Research* **12**, 271 (2005).
 171. G. Skarja;K. Woodhouse, In vitro degradation and erosion of degradable, segmented polyurethanes containing an amino acid-based chain extender. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **12**, 851 (2001).
 172. S. Oprea, Effect of composition and hard-segment content on thermo-mechanical properties of cross-linked polyurethane copolymers. *High Performance Polymers* **21**, 353 (2009).
-

-
173. R. K. Roeder; M. M. Sproul; C. H. Turner, Hydroxyapatite whiskers provide improved mechanical properties in reinforced polymer composites. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **67**, 801 (2003).
174. M. Rogulska; A. Kultys; W. Podkościelny, Studies on thermoplastic polyurethanes based on new diphenylethane-derivative diols. II. Synthesis and characterization of segmented polyurethanes from HDI and MDI. *European polymer journal* **43**, 1402 (2007).
175. H. J. Griesser, Degradation of polyurethanes in biomedical applications—A review. *Polymer degradation and stability* **33**, 329 (1991).
176. P. A. Gunatillake; G. F. Meijs; E. Rizzardo; R. C. Chatelier; S. J. McCarthy; A. Brandwood; K. Schindhelm, Polyurethane elastomers based on novel polyether macrodiols and MDI: Synthesis, mechanical properties, and resistance to hydrolysis and oxidation. *Journal of applied polymer science* **46**, 319 (2003).
177. J. V. Cauich-Rodríguez; L. H. Chan-Chan; F. Hernandez-Sánchez; J. M. Cervantes-Uc, Degradation of Polyurethanes for Cardiovascular Applications. (2013).
178. C.-C. L.H., ^Síntesis, Caracterización, degradación y evaluación biológica de poli(ueratano ureas)s segmentados Biodegradables a base de aminoácidos Centro de Investigación Científica de Yucatán 2012).
179. Y. X. Wang; J. L. Robertson; W. B. Spillman; R. O. Claus, Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility. *Pharmaceutical research* **21**, 1362 (2004).
180. W. Pentz; R. Krawiec, Hydrolytic Stability of Polyurethane Elastomers. *Rubber Age* **107**, 39 (1975).
-

181. G. N. Mathur;J. E. Kresta, en *Polymer Additives*, J. Kresta, Ed. (Springer US, 1984), pp. 135-153.
182. G. Skarja;K. Woodhouse, Synthesis and characterization of degradable polyurethane elastomers containing an amino acid-based chain extender. *Journal of biomaterials science, polymer edition* **9**, 271 (1998).
183. R. E. Z. Arce; A. M. M. Arce;M. J. C. Gómez, Analisis de la degradación enzimatica de espumas de poliuretano sintetizadas por un polilil mediante espectroscopias de infrarojo por transformada de furier. *Revista científica latinoamericana y el caribe* **21**, 19 (2006).
184. C. Ferris; M. Violante De Paz; F. Zamora;J. A. Galbis, Dithiothreitol-based polyurethanes. Synthesis and degradation studies. *Polymer Degradation and Stability* **95**, 1480 (2010).
185. Y. Takemura; M. Satoh; K. Satoh; H. Hamada; Y. Sekido;S. Kubota, High dose of ascorbic acid induces cell death in mesothelioma cells. *Biochemical and biophysical research communications* **394**, 249 (2010).
186. L. Chan-Chan; C. Tkaczyk; R. Vargas-Coronado; J. Cervantes-Uc; M. Tabrizian;J. Cauich-Rodriguez, Characterization and biocompatibility studies of new degradable poly (urea) urethanes prepared with arginine, glycine or aspartic acid as chain extenders. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 1 (2013).

Publicaciones

Artículos

- S. M. Cetina-Díaz ¹, L. H. Chan-Chan ¹, R. F. Vargas-Coronado ¹, J.M. Cervantes-Uc ¹, P. Quintana-Owen ², K. Paakinaho ³, M. Kellomaki ³, L. Di Silvio ⁴, S. Deb ⁴, J.V. Cauich-Rodríguez ¹. Physicochemical Characterization of Segmented Polyurethanes Prepared with Glutamine or Ascorbic Acid as Chain Extenders and their Hydroxyapatite Composites. DOI:10.1039/C3TB2. Publicado J. Mater. Chem. B, 2014, **2**, 1966-1976, 2014.

Congresos

- Síntesis y Caracterización de Poliuretanos Segmentados Biodegradables para la Regeneración ósea. Congreso de estudiantes, CICY. Mérida Yucatán. 2010.
- Ha composites of Segmented Polyurethanes Prepared with Glutamine or Ascorbic Acid as chain Extenders for Bone Tissue Regeneration. European conference on materials: Dublin Irland 2011.
- Preparación de Materiales Compuestos a base de Poliuretanos Segmentados e Ha para la Regeneración Ósea. XIV congreso de estudiantes del CICY. Mérida Yucatán 2011. Obteniendo el segundo lugar en competencia de cartel.