



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN MATERIAL  
COMPUESTO DE POLIURETANO Y TITANIO PARA  
USO POTENCIAL EN REGENERACIÓN DE DEFECTOS  
ÓSEOS

**Tesis que presenta**

M. en C. FERNANDO JAVIER AGUILAR PÉREZ

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS  
(MATERIALES POLIMÉRICOS)

Mérida, Yucatán, México. Agosto de 2018.

---

*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.  
POSGRADO EN CIENCIAS MATERIALES POLIMÉRICOS*



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de FERNANDO JAVIER AGUILAR PÉREZ titulado DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN MATERIAL COMPUESTO DE POLIURETANO Y TITANIO PARA USO POTENCIAL EN REGENERACIÓN DE DEFECTOS ÓSEOS fue realizado en la Unidad de Materiales en la línea de Materiales para Medicina Regenerativa, en los laboratorios de Laboratorios Físicoquímica, Química, Mecánica del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Materiales Poliméricos de nuestro Centro.

Atentamente.



---

Dr. Manuel Martínez Estévez  
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 07 de Agosto de 2018.

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:  \_\_\_\_\_

Nombre: M. en C. Fernando Javier Aguilar Pérez

## **DEDICATORIA**

A mis hijos Leonardo y Fernando, que son el motor fundamental de mi vida...

A mi esposa Martha, por su apoyo, confianza, dedicación y un interminable etcétera...

A mis padres Soemy y Fernando por haberme alentado a seguir adelante...

A mis hermanitos Yarely, Soemy y David, por siempre estar ahí.

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia y amigos.

A mis maestros y compañeros.

A mis directores de tesis, Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez, y Dr. Juan José Pavón Palacio (q.e.p.d.) de la Universidad de Antioquía, Colombia.

A mi comité tutorial, Dra. Lerma Chan Chan y Dr. Manuel Aguilar Vega.

Al Dr. Raúl Rosales Ibañez, por su colaboración en las pruebas celulares.

Al Dr. Yadir Torres y Dr. José Rodríguez, de la Universidad de Sevilla, España.

Al Dr. José Manuel Cervantes Uc y la Dra. Neyeli Rodríguez Fuentes.

A la I.Q. Rossana Faride Vargas Coronado, por el apoyo técnico y logístico, así como a los técnicos Silvia Andrade, Javier Cauich, Hugo Carrillo y María Isabel Loría.

A la Dra. Patricia Quintana Owen, al Mtro. Daniel Aguilar, al Ing. Wilian Cauich y al Dr. Santiago González del CINVESTAV-Mérida del Instituto Politécnico Nacional.

Al Dr. Humberto Vázquez de la Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, al Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales, y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada número 389314, y por los apoyos otorgados a través de los diferentes proyectos que hicieron posible esta tesis (1360 y 248378).

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE.....</b>	<b>i</b>
<b>LISTADO DE TABLAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTADO DE FIGURAS .....</b>	<b>v</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>x</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>4</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
Objetivo General.....	5
Objetivos Específicos.....	5
<b>CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES .....</b>	<b>6</b>
1.1. Tejido Óseo.....	6
1.2. Defectos Óseos.....	10
1.3. Corrección de Defectos Óseos.....	10
1.4. Poliuretanos Biodegradables .....	15
1.5. Biodegradación de Poliuretanos para Aplicaciones Médicas.....	17
1.6. Poliuretanos Biodegradables a Base de Aceite de Ricino .....	20
1.7. Espumas de Materiales Compuestos a Base de Poliuretano Biodegradable .....	20
1.8. Titanio como Biomaterial .....	22
1.9. Tratamiento Superficial de Partículas de Titanio.....	23
1.10. Biomateriales Compuestos de PU y Ti.....	24
1.11. Mecanismo de Biocompatibilidad del Ti con las Células .....	25
1.12. Hidrofilia de los Materiales Compuestos de PU/Ti.....	26
1.13. Pruebas Biológicas con Células Troncales de Pulpa Dental Adulta Humana.....	27
<b>CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
<b>2.1. Partículas de Titanio .....</b>	<b>28</b>
Materiales.....	28

Métodos.....	28
2.1.1. Caracterización de las Partículas de Titanio.....	28
2.1.2. Tratamiento Superficial de las Partículas de Titanio.....	30
<b>2.2. Materiales Compuestos de Poliuretano y Titanio en Forma de Película .....</b>	<b>31</b>
Materiales.....	31
Métodos.....	31
2.2.1. Síntesis de Poliuretano y Obtención de Películas.....	31
2.2.2. Caracterización Físicoquímica de las Películas de SPU-G/Ti .....	33
2.2.3. Caracterización Mecánica de las Películas de SPU-G/Ti.....	36
2.2.4. Pruebas de Degradación <i>in vitro</i> de las Películas de SPU-G/Ti.....	37
2.2.5. Ensayos de Citotoxicidad de las Películas de SPU-G/Ti.....	37
<b>2.3. Materiales Compuestos a Base de Poliuretano y Titanio en Forma de Espuma...41</b>	
Materiales.....	41
Métodos.....	41
2.3.1. Obtención de Espumas de Poliuretano puro y materiales compuestos de PU y Ti .....	41
2.3.2. Caracterización Físicoquímica de las Espumas de PU/Ti .....	42
2.3.3. Caracterización Mecánica de las Espumas de PU/Ti .....	45
2.3.4. Pruebas de Degradación <i>in vitro</i> de las Espumas de PU/Ti.....	46
2.3.5. Ensayos de Biocompatibilidad de las Espumas de PU/Ti.....	46
<b>2.4. Análisis de Resultados .....</b>	<b>47</b>
<b>CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
<b>3.1. Partículas de Titanio .....</b>	<b>48</b>
3.1.1. Caracterización de las Partículas de Titanio .....	48
3.1.2. Tratamiento Superficial de las Partículas de Titanio .....	57
<b>3.2. Materiales Compuestos de Poliuretano y Titanio en Forma de Película .....</b>	<b>61</b>
3.2.1. Caracterización Físicoquímica de las Películas de SPU-G/Ti.....	61
3.2.2. Caracterización Mecánica de las Películas de SPU-G/Ti .....	78
3.2.3. Pruebas de Degradación <i>in vitro</i> de las Películas de SPU-G/Ti .....	83
3.2.4. Ensayos de Biocompatibilidad de las Películas de SPU-G/Ti .....	84
<b>3.3. Materiales Compuestos a Base de Poliuretano y Titanio en Forma de Espuma...89</b>	
3.3.1. Caracterización Físicoquímica de las Espumas de PU/Ti .....	89
3.3.2. Caracterización Mecánica de las Espumas de PU/Ti.....	104
3.3.3. Pruebas de Degradación <i>in vitro</i> de las Espumas de PU/Ti .....	109

3.3.4. Ensayos de Biocompatibilidad de las Espumas de PU/Ti .....	111
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>115</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>118</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>131</b>
Anexo 1. Productos Académicos Derivados de esta Investigación.....	131

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1. Cantidades utilizados para la preparación de las películas de SPU-G/Ti. ....	32
Tabla 2.2. Reactivos para la preparación de las espumas de PU y PU/Ti.....	42
Tabla 3.1. Análisis elemental por XPS de las partículas de Ti tratadas y no tratadas. ....	54
Tabla 3.2. Composición elemental de las películas de SPU-G y Ti por EDX. ....	65
Tabla 3.3. Composición elemental (at%) por EDX y XPS de las películas de SPU-G/Ti...	66
Tabla 3.4. Análisis elemental (at%) por XPS de las películas de materiales compuestos con partículas de Ti tratadas y no tratadas. ....	67
Tabla 3.5. Parametros relacionados con la degradación térmica por TGA.....	68
Tabla 3.6. Propiedades dinámico mecánicas obtenidas del análisis DMA. ....	71
Tabla 3.6. Valores de L para PCL y películas de los materiales de SPU-G y Ti.....	77
Tabla 3.7. Cristalinidad porcentual de los materiales. ....	78
Tabla 3.8. Ángulos de contacto de las superficies de las películas de PU/Ti. ....	78
Tabla 3.9. Propiedades mecánicas a tensión de películas de SPU/Ti, con velocidad de desplazamiento de cabezal a 50 mm/min. ....	79
Tabla 3.10. Propiedades mecánicas a tensión de películas de SPU-G/Ti, con velocidad de desplazamiento de 250 mm/min.....	81
Tabla 3.11. Degradación de los materiales en diferentes medios por reflujo a 100 °C durante 24 h, reportadas como masa perdida (%). ....	83
Tabla 3.12. Propiedades de las espumas de PU sintetizadas con distintos catalizadores al 0.5%. ....	90
Tabla 3.13. Propiedades de Espumado de los materiales compuestos de PU y Ti. ....	91
Tabla 3.14. Análisis Elemental por EDX de los materiales compuestos (Wt. %). ....	96
Tabla 3.15. Composición elemental por EDX y por XPS de las espumas de materiales compuestos PU/Ti. ....	98
Tabla. 3.16. Resumen propiedades de degradación térmica por TGA.....	100
Tabla 3.17. Módulos de almacenamiento, E', de las espumas de PU y PU/Ti por DMA.	102
Tabla 3.18. Propiedades mecánicas de compresión de las espumas de PU, materiales compuestos, y de la espuma de PU con dibutil dilaurato de estaño como catalizador. ....	105
Tabla 3.19. Degradación de los materiales en diferentes medios por reflujo a 100°C durante 24 h, reportadas como masa perdida (%). ....	109

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Hueso esponjoso y hueso cortical o compacto [19].....	9
Figura 1.2. a) Prototipo de un soporte de titanio para ingeniería tisular, y b) Imagen SEM del soporte de titanio a 25x [56].....	23
Figura 2.1. Medición del ángulo de contacto mediante el método de gota sésil.....	36
Figura 2.2. Síntesis del prepolímero del poliuretano a base de aceite de ricino, CO.....	42
Figura 2.3. Cubo de espuma de material compuesto siendo pesado para la determinación de la densidad.....	44
Figura 2.4. Determinación de la densidad del polímero sin espumar, por el principio de Arquímedes.....	45
Figura 3.1. Distribución de tamaños de partícula de titanio determinado por DL.....	48
Figura 3.2. Distribución de tamaños de partícula de tianio determinado por DSL.....	49
Figura 3.3. Espectro de FTIR de las partículas de titanio.....	50
Figura 3.4. Espectro Raman de las partículas de titanio.....	51
Figura 3.5. Imágenes MEB de partículas de titanio.....	52
Figura 3.6. Análisis elemental por EDX de las partículas de titanio.....	52
Figura 3.7. DRX de partículas de titanio.....	53
Figura 3.8. Espectro de XPS (inspección) de las partículas de titanio, realizadas en la superficie y posterior a una erosión por 30 s.....	54
Figura 3.9. Deconvolución del pico O1s del XPS de la superficie erosionada de las partículas de titanio.....	55
Figura 3.10. Deconvolución del pico Ti2p del XPS de la superficie erosionada de las partículas de titanio.....	56
Figura 3.11. Espectros XPS de las partículas de titanio activadas y no activadas.....	58
Figura 3.12. Deconvolución del pico O1s del XPS de la superficie de las partículas de titanio activadas.....	59
Figura 3.13. Deconvolución del pico Ti2p del XPS de la superficie de las partículas de titanio activadas.....	60
Figura 3.14. Espectro FTIR de las películas de SPU-G y Ti.....	62
Figura 3.15. Espectroscopía Raman de las películas de SPU-G y Ti.....	63
Figura 3.16. Micrografías SEM (x5,000) de las películas de SPU-G (a), y materiales compuestos de 1% Ti (b), 3% Ti (c), y 5% Ti (d).....	63

Figura 3.17. Mapeo para titanio por EDX de las películas de los materiales compuestos a) SPU-G/1% Ti, b) SPU-G/3% Ti, y c) SPU-G/5% Ti.....	64
Figura 3.18. Espectros obtenidos mediante XPS de las películas de materiales compuestos de SPU-G/Ti.....	66
Figura 3.19. Espectros XPS de las películas de SPU-G/5% Ti, no activado y activado.....	67
Figura 3.20. Termograma de masa en función de temperatura de las películas por TGA... 69	69
Figura 3.21. Termograma de la primera derivada de la masa de las películas por TGA.....	70
Figura 3.22. Termograma de DMA. Variación de módulo de almacenamiento con la temperatura de materiales compuestos de poliuretano y titanio. ....	72
Figura 3.23. Termograma de DMA. Variación de $\tan \delta$ con la temperatura de materiales compuestos de poliuretano y titanio.....	73
Figura 3.24. Termograma DSC de las películas de SPU-G y materiales compuestos.....	74
Figura 3.25. Difractograma DRX de las películas de SPU-G y Ti. ....	75
Figura 3.26. Gráfica de SAXS (datos obtenidos del equipo) de PCL, y películas de SPU-G y materiales compuestos de SPU-G y Ti.....	76
Figura 3.27. Gráfica de SAXS (datos tratados matemáticamente) de PCL, y películas de SPU-G y materiales compuestos de SPU-G y Ti.....	77
Figura 3.28. Curva esfuerzo-deformación de tensión a bajas tasas de deformación de las películas de SPU-G y materiales compuestos de SPU-G/Ti.....	80
Figura 3.29. Curva esfuerzo-deformación de tensión a altas tasas de deformación de las películas de SPU-G y materiales compuestos de SPU-G/Ti.....	82
Figura 3.30. Imágenes de microscopia fluorescente de viabilidad celular para CTPDH (a), y Osteoblastos (b), a 24 horas y 10 días sobre películas de SPU-G y Ti, por el método live/dead. ....	85
Figura 3.31. Conteo de COR por campo sobre películas de SPU-G y Ti. ....	86
Figura 3.32. Proliferación celular de CTPDH en las películas de SPU-G y Ti. *Indica diferencia significativa entre grupos ( $p \leq 0.05$ ). ....	87
Figura 3.33. Proliferación celular de osteoblastos en las películas de SPU-G y Ti. *Indica diferencia significativa entre grupos ( $p \leq 0.05$ ). ....	88
Figura 3.34. Imagen de las espumas de los materiales a) PU, b) PU/1% Ti, c) PU/3% Ti, y d) PU/5% Ti. ....	89
Figura 3.35. FTIR de espuma y reactivos de la síntesis.....	92
Figura 3.36. Espectros de infrarrojo de la espuma de poliuretano a 24 horas y 7 días.....	93
Figura 3.37. Espectro de FTIR de las espumas de los materiales compuestos.....	94

Figura 3.38. Espectro Raman de las partículas de titanio y las espumas de materiales compuestos.....	95
Figura 3.39. Imágenes MEB de las espumas a) PU, b) PU/1% Ti, c) PU/3% Ti, y d) PU/5% Ti. ....	95
Figura 3.40. Imágenes SEM (imagen superior) con su correspondiente mapeo (imagen inferior) por EDX para titanio (rojo), de los materiales compuestos de PU/Ti al 1% (a), 3% (b), y 5% (c). ....	97
Figura 3.41. Espectros obtenidos mediante XPS de las espumas de materiales compuestos de PU/Ti. ....	98
Figura 3.42. Termograma de masa contra temperatura del TGA de espumas de materiales compuestos. ....	99
Figura 3.43. Primera derivada de la masa contra temperatura del TGA de espumas de materiales compuestos. ....	100
Figura 3.44. Termograma de DMA de las espumas de poliuretano y titanio. Módulo de almacenamiento vs. temperatura. ....	101
Figura 3.45. Termograma de DMA de las espumas de poliuretano y titanio. Tan $\delta$ vs. temperatura. ....	102
Figura 3.46. DSC de las espumas de los materiales compuestos de PU/Ti. ....	103
Figura 3.47. Difractograma DRX de titanio, y espumas de poliuretano y materiales compuestos de 1, 3 y 5% de titanio. ....	104
Figura 3.48. Curva esfuerzo-deformación de compresión de las espumas de PU y materiales compuestos. ....	106
Figura 3.49. Gráfica de caja del ANOVA con prueba de Tukey del esfuerzo a 10% de deformación a compresión de las espumas. ....	107
Figura 3.50. Gráfica de caja del ANOVA con prueba de Tukey del módulo elástico de compresión de las espumas. ....	108
Figura 3.51. Espectrogramas FTIR de las películas posterior a la degradación (deg) en NaOCl. ....	110
Figura 3.52. Ensayos de viabilidad celular por Alamar Blue sobre las espumas de los materiales compuestos. *Indica diferencia significativa entre grupos ( $p \leq 0.05$ ). ....	112
Figura 3.53. Ensayos de proliferación celular por MTT sobre espumas de los materiales compuestos. *Indica diferencia significativa entre grupos ( $p \leq 0.05$ ). ....	114

## RESUMEN

Materiales compuestos a base de poliuretano (PU) y partículas de titanio (Ti) fueron obtenidos y conformados en forma de películas y espumas. Películas delgadas fueron preparadas a partir del polímero generado por la reacción de policaprolactona diol (PCL) como segmento flexible, y 4,4-metilen-bis ciclohexil diisocianato (HMDI) y L-Glutamina como segmento rígido. A este polímero fueron incorporadas partículas de titanio en forma de relleno a concentraciones de 1, 3 y 5 % p/p. La caracterización fisicoquímica mostró que los materiales compuestos mantenían las propiedades del poliuretano semicristalino, mientras que exhibían temperaturas de transición vítrea ( $T_g$ ) entre  $-35^\circ$  y  $-45^\circ$  °C, temperaturas de fusión ( $T_m$ ) a  $52^\circ$ C, y porcentaje de cristalinidad cercano al 40%, determinado por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y difracción de rayos X (DRX), sugiriendo que estas partículas no actúan como agentes nucleantes. El análisis DRX mostró además, reflexiones a  $21.3^\circ$  y  $23.6^\circ$  asociadas a la PCL y reflexiones a  $35.1^\circ$ ,  $38.5^\circ$  y  $40.2^\circ$  asociadas al Ti. La adición de hasta 5% de Ti redujo el esfuerzo tensil máximo y la deformación máxima de 1.9 MPa a 1.2 MPa, y de 670% a 172% para el polímero puro y el material compuesto, respectivamente. A pesar de que a bajas tasas de deformación se observaron diferencias significativas en las propiedades mecánicas de los materiales compuestos, no se presentaron diferencias significativas en el comportamiento mecánico de los materiales a altas tasas de deformación, donde los esfuerzo tensiles fueron de 8.5 MPa y la deformación máxima de 223% para el material compuesto de 5% de contenido de titanio. Las películas de los materiales compuestos fueron completamente degradadas en agua destilada, HCl,  $H_2O_2$  y NaOH. La incorporación de partículas de titanio tuvo un efecto positivo en la viabilidad y proliferación de células troncales de pulpa dental humana (CTPDH), y con células osteoblásticas de ratón la proliferación celular de los materiales aumentó con la concentración de titanio presente, hasta por 10 días de incubación.

Las espumas de PU y Ti fueron preparadas a base de aceite de ricino (CO) y diisocianato de isoforona (IPDI) como matriz polimérica, y con 1, 3 y 5% de Ti. La síntesis del PU fue confirmada por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), y la

presencia de las partículas de titanio se detectó por espectroscopia Raman, DRX (pico principal a  $2\theta = 40.2^\circ$ ) y mediante mapeo por EDX. Las espumas mostraron tres temperaturas principales de descomposición ( $T_d$ ) entre los 300 °C y los 500 °C, y dicha degradación no fue catalizada por la presencia de las partículas de titanio. El módulo a compresión (164-846 kPa), el esfuerzo a compresión (12.9-116.7 kPa) y la densidad (128-240 kg/m<sup>3</sup>) tendieron a incrementarse con la concentración de titanio presente en las espumas, pero la porosidad se redujo (de 87% a 80%). Las espumas de los materiales compuestos fueron completamente degradadas en medios ácido, oxidativo, parcialmente degradadas en medio alcalino, mientras que permanecieron estables en agua destilada. La viabilidad de CTPDH en todos los materiales fue mayor al 80% hasta los 14 días de incubación, mientras que la proliferación celular cayó hasta 60% a los 21 días.

En general, los resultados de las pruebas realizadas tanto a películas como a espumas de PU y Ti, sugieren que los materiales compuestos pueden ser utilizados como soportes en medicina regenerativa para corrección de defectos óseos.

## ABSTRACT

Composites based on polyurethane (PU) and titanium particles (Ti), were obtained and manufactured as thin films or foams to evaluate its' potential use in bone tissue regeneration. Films were prepared with polycaprolactone diol as soft segment and 4,4-methylene-bis cyclohexyl diisocyanate and L-glutamine as the rigid segment. These PU's were filled with 1, 3 and 5 wt.% of Ti particles. Physicochemical characterization showed that composites retained the properties of the semicrystalline polyurethane as they exhibited a glass transition temperature ( $T_g$ ) between -35 °C and -45 °C, melting temperature ( $T_m$ ) at 52 °C and crystallinity close to 40% as determined by DSC and X-ray diffraction (XRD), suggesting that these particles are not acting as nucleating agents. In agreement with this, XRD showed reflections at 21.3° and 23.6° for PCL and reflections at 35.1°, 38.4° and 40.2° for Ti particles. The addition of up to 5 wt.% of Ti reduced both, tensile strength and maximum strain from 1.9 MPa to 1.2 MPa, and from 670% to 172% for pristine and filled polyurethane respectively. Although there were differences between composites at low strain rates no significant differences in mechanical behavior were observed at higher strain rate where a tensile stress of 8.5 MPa and strain of 223% of strain were observed for 5 wt.% composites. Composites' films were fully degraded in distilled water, HCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NaOH. The addition of titanium particles had a positive effect on cell adhesion and proliferation with HDPSC, and cell proliferation where osteoblasts increased with the amount of titanium in composites up to 10 days of incubation.

PU and Ti foams were prepared with castor oil and isophorone diisocyanate as polymeric matrix, and 1, 3 and 5 wt.% of Ti. PU synthesis was confirmed by FTIR, but the presence of Ti was detected by Raman, X-ray diffraction (peak at  $2\theta = 40.2^\circ$ ) and by EDX-mapping. Materials showed three decomposition temperatures between 300 °C and 500 °C and their decomposition were not catalyzed by Ti particles. Compressive modulus (164-846 kPa), compressive strength (12.9-116.7 kPa) and density (128-240 kg/m<sup>3</sup>) tend to increase with Ti concentration but porosity was reduced (from 87% to 80%). Composites' foams were fully degraded in acid and oxidative media while remained stable in distilled water. HDPSC

viability on all composites was higher than 80% up to 14 days while proliferation dropped up to 60% at 21 days.

Overall, the results for films and foams of PU and Ti, suggest that these composites can be used as scaffolds for bone tissue regeneration.

## INTRODUCCIÓN

Las diversas desventajas asociadas con los materiales convencionales empleados como injertos o sustitutos de tejidos duro conducen a la necesidad de encontrar nuevas alternativas para brindarles a los pacientes la posibilidad de recuperar su calidad de vida. En este contexto, ha habido un interés significativo en nuevos campos de aplicación como la medicina regenerativa [1], que resulta además, en un mercado potencialmente atractivo.

Se estima que más de 4 millones de procedimientos de injertos óseos son realizados anualmente en el mundo [2], de éstos, 1.5 millones son en Estados Unidos de América [3]; debido a esta demanda de reemplazos óseos, la cantidad de tejido donante es insuficiente. El mercado de injertos óseos en EUA se estima en 2,500 millones de dólares americanos, con un crecimiento anual sostenido del 13% [3].

La ingeniería de tejidos (IT) tiene como principal objetivo el desarrollo de un tejido nuevo que repare o sustituya al tejido u órgano dañado; es una rama multidisciplinaria, pues involucra la química, física, biología y medicina [4,5]. De este modo, la IT es una alternativa más de tratamiento y está sustentada en la reconstrucción o remodelación de tejidos y/u órganos con tejido nuevo, el cual es desarrollado a partir de las células del mismo paciente, minimizando así la posibilidad de rechazo inmunológico y la transmisión de enfermedades. La ingeniería de tejidos tiene tres componentes fundamentales que son: el soporte (scaffolds), las células y los factores de crecimiento [1]. Los soportes pueden estar elaborados a base de materiales no biodegradables, como cerámicos o metálicos como el titanio [6], o biodegradables, como algunos materiales poliméricos o metales a base de magnesio; éstos pueden clasificarse en naturales, como el tejido descelularizado, colágena, alginato [7,8], y sintéticos como poli (ácido láctico), poliamida, poliuretano [9], entre otros. Algunos materiales poliméricos biodegradables pueden tener gran flexibilidad y adaptarse a los requerimientos mecánicos del tejido nativo y de procesamiento.

Por su parte, los poliuretanos segmentados (SPU) biodegradables han sido reportados y ampliamente estudiados para aplicaciones en el campo de la medicina regenerativa de tejido óseo debido a sus condiciones de biodegradación, baja toxicidad y alta biocompatibilidad. Adicionalmente, los SPU son materiales que permiten crear estructuras tridimensionales porosas con las características específicas para su aplicación como andamios en medicina regenerativa de tejido óseo, y su degradación *in vivo* se va llevando a cabo al tiempo que la masa ósea aumenta en la zona del injerto [10]. La principal deficiencia del SPU para su utilización en medicina regenerativa de tejido óseo son sus propiedades mecánicas debido a su alto porcentaje de deformación y bajo módulo elástico [11], que distan de las características propias del hueso cortical, e incluso del hueso trabecular. Con el fin de disminuir esta brecha se han estudiado materiales compuestos de SPU y distintos biomateriales cerámicos, como la hidroxiapatita (HA) o vidrio bioactivo (VB), o metálicos como el titanio (Ti).

El titanio es un biomaterial metálico, considerado como una excelente opción para el reemplazo óseo debido a sus características biocompatibles, lo cual se ha asociado al excelente comportamiento *in vivo* debido al buen balance entre sus propiedades mecánicas, fisicoquímicas y biofuncionales.

La literatura reporta que materiales compuestos de poliuretano segmentado y Ti han sido caracterizados para la determinación de sus propiedades y determinar sus posibles campos de aplicación [12]. Si bien es cierto que en la actualidad existen materiales con estas características, es importante seguir evolucionando hacia una mejor integración del injerto con el hueso receptor, que se lograría reduciendo las diferencias entre las propiedades mecánicas de los materiales actualmente disponibles, y las del hueso esponjoso.

Este estudio pretende obtener materiales compuestos de PU y Ti, en los cuales las partículas de titanio se encuentren dispersas en una matriz de SPU, y determinar su potencial utilización en la regeneración de defectos óseos. Estos materiales compuestos y biocompatibles se espera que tengan un potencial para su posible aplicación como materiales a partir de los cuales se pudieran construir andamios en medicina regenerativa de tejido óseo. En el capítulo 1 de esta tesis se plantea el estado del arte y los antecedentes

respecto a la regeneración ósea y los materiales utilizados, así como los reportados recientemente, mientras que en el capítulo 2 se describe la parte experimental, detallando los materiales y métodos utilizados; en el capítulo 3 se presentan los resultados, así como la discusión de los mismos; por último se plantean las conclusiones derivadas de esta tesis.

## **HIPÓTESIS**

Los materiales compuestos de poliuretano y partículas de titanio desarrollados en forma de películas y espumas, presentan propiedades físico-químicas, mecánicas, y de biocompatibilidad, que les confieren la capacidad de ser utilizados en regeneración de defectos óseos.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Desarrollar y evaluar un material compuesto a base de poliuretanos biocompatibles y partículas de titanio, para determinar su potencial uso en regeneración de defectos óseos.

### Objetivos Específicos

1. Caracterizar fisicoquímicamente las partículas de titanio mediante FTIR, Raman, MEB, EDX, DRX.
2. Obtener materiales compuestos de PU y Ti, en forma de espuma y película, variando la concentración del Ti desde 1 hasta 5% p/p.
3. Caracterizar fisicoquímicamente los materiales compuestos sintetizados mediante FTIR, Raman, TGA, DSC, DMA, MEB, EDX, DRX.
4. Determinar las propiedades mecánicas de tensión (películas) y compresión (espumas) de los materiales compuestos.
5. Estudiar la degradación *in vitro* de los materiales compuestos en medios ácidos, alcalinos y oxidantes.
6. Establecer la biocompatibilidad de los materiales compuestos mediante pruebas de viabilidad y proliferación de osteoblastos y células troncales de pulpa dental.

## CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

### 1.1. Tejido Óseo

Los esqueletos son estructuras mineralizadas que generalmente están compuestas por arreglos tridimensionales recurrentes de estructuras cristalinas [13]. El esqueleto humano tiene 206 huesos, y pesa aproximadamente 9 kilogramos. El hueso es un tejido rígido de soporte y participa en los movimientos y la estabilidad postural del cuerpo humano, trabajando conjuntamente con los músculos. Los huesos también juegan un papel importante en el metabolismo del calcio y otros minerales como el fósforo, son reservorio de grasas en la médula ósea amarilla y, son los responsables de la producción de células sanguíneas; también contribuyen a la regulación de los niveles de azúcar en sangre [14]. A pesar de su estructura rígida, en el hueso existe una constante remodelación; aproximadamente el 6% del total del hueso en el cuerpo humano es remodelado cada año [15].

La masa ósea total en el adulto humano alcanza su máximo nivel durante la segunda década de vida y a partir de ahí desciende gradualmente debido a que la velocidad de formación ósea es excedida por la de reabsorción; a medida que aumenta la edad, la masa ósea total decrece aproximadamente 1% al año, y en mujeres menopáusicas alcanza el 3% de decrecimiento anual. En los sitios de remodelación, los osteoblastos producen hueso nuevo, mientras los osteoclastos reabsorben el tejido óseo existente. Cada tipo de célula es regulada por una variedad de hormonas y factores locales. Si el balance entre la producción de hueso y la reabsorción se pierde por una producción descontrolada de estos reguladores, la estructura del hueso será dañada y el sujeto será susceptible de padecer osteoporosis y/u osteopetrosis [16].

El tejido óseo es una combinación compleja de tres diferentes componentes, llamados fase inorgánica, fase orgánica y fase celular. La fase celular se compone a su vez, de tres diferentes tipos de células: los osteoblastos, encargados de la formación del hueso, los osteoclastos encargados de la reabsorción del hueso y, los osteocitos, que son células osteogénicas que han quedado rodeadas y atrapadas por el hueso, y que provienen de los osteoblastos. Cada tipo de estas células posee una función específica para el proceso de remodelación y contribuye a mantener el correcto equilibrio entre la formación y la reabsorción ósea a través de los mecanismos de la síntesis y regulación del depósito y mineralización de la matriz extracelular ósea. La fase orgánica está compuesta por fibras de colágena, glicoproteínas, proteoglicanos, sialoproteínas y otras proteínas como factores de crecimiento y citoquinas, que desempeñan un papel especial en el control de la osteogénesis [17]. La mayoría de las proteínas de esta matriz ósea son secretadas y depositadas por osteoblastos maduros, los cuales están alineados en la superficie del hueso. La expresión de proteínas de la matriz extracelular relacionadas con el hueso, la mayor actividad enzimática de la fosfatasa alcalina, la respuesta de las hormonas osteotrópicas y citoquinas, se cree que son las funciones más importantes del osteoblasto [16]. La fase inorgánica o mineral representa entre el 65 y 70% de la matriz extracelular y está principalmente formada por cristales de hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , distribuidos en las fibras de colágeno, y determinan el soporte estructural y las propiedades mecánicas del hueso. La formación de los cristales de HA es también regulada por los osteoblastos.

La distribución de las fases orgánica e inorgánica depende de un proceso altamente complejo que toma lugar durante la formación ósea. Cada uno de estos componentes puede ser ensamblado a diferentes proporciones formando dos arquitecturas estructurales, dependiendo del tipo y función del hueso. Estas están caracterizadas por diferencias estructurales que se relacionan fuertemente con el desempeño mecánico del tejido. Estos dos tipos de estructuras son el hueso cortical o compacto, que posee una estructura densa, y el hueso esponjoso o trabecular, el cual es menos denso y menos rígido que el hueso compacto (Figura 1.1). El hueso cortical es encontrado en la pared externa de los huesos largos y es responsable de las funciones protectoras y de soporte, jugando un rol primario

en el soporte de cargas. Representa el 80% del total del esqueleto en huesos largos, cortos y planos. El hueso esponjoso representa el 20% del total del esqueleto, es una red altamente porosa que conforma un arreglo tridimensional de trabéculas, las cuales contienen médula y vasos sanguíneos; a pesar de esto, el hueso esponjoso participa en la sustentación de carga y principalmente disminuye las concentraciones de esfuerzos para prevenir trauma en las interfaces con tejido blando como cartílagos y meniscos; se encuentra en casi todas las áreas de hueso que nos son sujetas a un alto estrés mecánico o en uniones donde existe la necesidad de reducir las concentraciones locales de esfuerzos. Desde la perspectiva de la ciencia de materiales, el hueso es considerado un material compuesto complejo hecho de una fase mineral y una orgánica [17].

Con respecto a las propiedades mecánicas del hueso, los módulos elásticos a compresión del hueso cortical y esponjoso humano son de 7 a 25 GPa y de 10 a 1000 MPa respectivamente, mientras que la resistencia a compresión es de 50 a 150 MPa y de 0.9 a 5 MPa, respectivamente [2,6,18]. La densidad del hueso esponjoso es entre 200 kg/m<sup>3</sup> y 0.6 g/cm<sup>3</sup> mientras que la del hueso cortical es entre 1.5 g/cm<sup>3</sup> y 1900 kg/m<sup>3</sup> [6]. La alta variabilidad entre las propiedades mecánicas del hueso cortical y esponjoso, se debe a que cada hueso del esqueleto humano tiene sus propias características, además de la variación entre diferentes individuos.

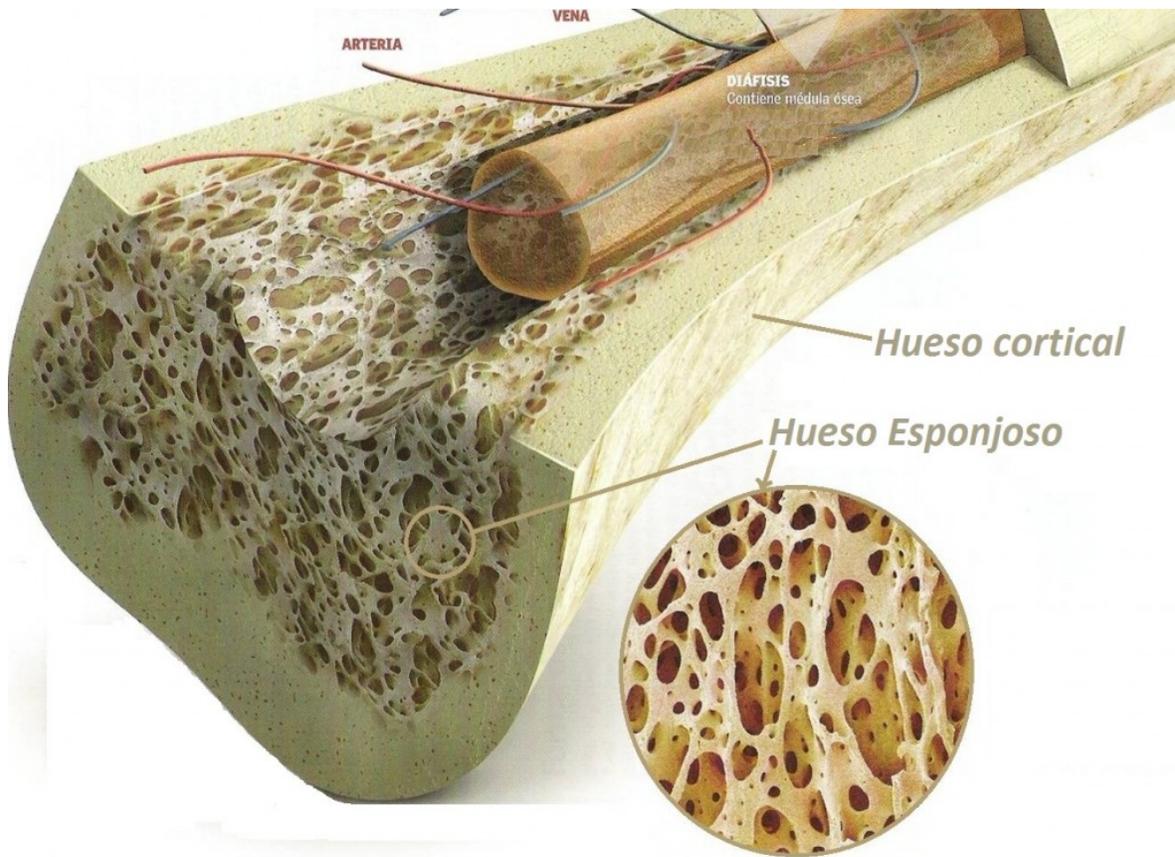


Figura 1.1. Hueso esponjoso y hueso cortical o compacto [19].

La formación de depósitos de calcio depende de la biomineralización de las fibras de colágeno, mecanismo que puede ser explicado por dos teorías: la primera, es la nucleación directa de los cristales de fosfato de calcio por las fibras de colágeno, la cual propone que pequeñas porciones de fosfato de calcio se adhieren a las fibras de colágeno atrapándose y uniéndose, formando una red que crece y migra a través de la fibras hasta solidificarse en una fase amorfa de fosfato de calcio, que se transforma a su vez, en cristales apatíticos orientados según el arreglo de las fibras de colágeno; la segunda, es la mineralización de la matriz mediada por una vesícula matricial, la cual sugiere que los osteoblastos forman una vesícula matricial intracelular que contiene cristales de fosfato de calcio, los cuales se depositarán en las fibras de colágeno [18].

## **1.2. Defectos Óseos**

Los defectos óseos son aquellos hallazgos anatómicos anormales de los huesos en los cuales se observa una falta de material óseo [20]; las causas de dichos defectos suelen ser variadas, al igual que su forma y ubicación. Estos defectos se presentan como ausencia total de material óseo, o como bajos niveles de volumen óseo como los producidos por enfermedades degenerativas. Esta falta o carencia de tejido óseo puede ser de extensión variable [15].

Los defectos óseos son una enfermedad grave, que puede sobrevenir después de un proceso patológico. El más común de los eventos causantes es el traumatismo, y la infección posterior [20]. El traumatismo, neoplasias, defectos congénitos, infecciones, entre otros, son todos capaces de crear grandes defectos óseos [21]. Con respecto al traumatismo, se puede puntualizar que normalmente posterior a éste, el hueso suele curar espontáneamente, en un tiempo considerable, siempre y cuando no existan agentes patógenos asociados [22]. Adicionalmente, es posible que exista un retraso en la cicatrización o la no unión de los bordes del hueso, fenómenos que se producen en el 5 por ciento de todas las fracturas, y en el 20 por ciento de las fracturas de alto impacto [2].

Otro agente etiológico de importancia para los defectos óseos son las resecciones tumorales, extirpaciones quirúrgicas de tumores óseos, o procedimientos quirúrgicos que involucren hueso. La razón de dicha sobreextensión radica en el hecho de que las dimensiones de los tumores suelen ser amplias, y los procedimientos quirúrgicos son radicales y altamente invasivos para asegurar la extirpación completa del tumor, reduciendo el riesgo de una recidiva [2].

## **1.3. Corrección de Defectos Óseos**

En la corrección de defectos óseos se han empleado diversas estrategias que incluyen el uso de injertos óseos, materiales sintéticos, estímulos mecánicos, entre otros. El estándar de oro

para el tratamiento de los defectos en huesos es el uso de injertos óseos autólogos, provenientes del mismo paciente [23].

Los injertos de hueso se realizan para restaurar el tejido que se ha perdido debido a un traumatismo o enfermedad. Hay un número de opciones disponibles actualmente que se diferencian en su resistencia mecánica y capacidad osteoconductiva, osteoinductora, y su potencial osteogénico. La elección de injerto o sustituto de injerto de hueso, depende de los siguientes factores: la aplicación clínica prevista, el tamaño del defecto y la masa total requerida, las propiedades biomecánicas, la composición química; la disponibilidad, la bioactividad deseada, la tasa de reabsorción esperada; las características de manejo quirúrgico, los efectos secundarios asociados, el costo, y las implicaciones éticas [2].

Los métodos comúnmente utilizados para la corrección de defectos óseos son el uso de: injertos óseos naturales (autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos), hueso artificial, o materiales sintéticos (HA y  $\beta$ -TCP, entre otros), plasma rico en plaquetas, matriz ósea desmineralizada, amelogenina, regeneración ósea guiada, distracción osteogénica, materiales poliméricos, así como materiales compuestos (polímeros con partículas de relleno).

### *Injertos Óseos Autólogos y Hueso Artificial*

A pesar que los injertos óseos autólogos, es decir tomados del mismo paciente, son el método clínico más efectivo para la regeneración ósea [19], tienen grandes limitantes como: requerir tiempos quirúrgicos prolongados, la limitada disponibilidad de tejido transplantable, la inflamación del sitio donante y su posterior recuperación, la cual suele tardar más que la recuperación del defecto original, entre otras [24]. Otras alternativas como los aloinjertos, que son material óseo proveniente de otro individuo, y los xenoinjertos, de origen animal, pueden producir reacciones de rechazo por procesos inmunológicos o infecciosos, transmitir enfermedades, o ser reabsorbidos por falta de osteoinducción. La HA y otros fosfatos como el beta fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) o sulfato de calcio, son utilizados como materiales de hueso artificial [25]. Debido a que estos materiales de fosfato de calcio no tienen una capacidad osteoinductora, se utilizan

conjuntamente con injertos óseos autólogos u otros métodos de aumento óseo como pueden ser la regeneración ósea guiada, el plasma rico en plaquetas o la distracción osteogénica [15].

### *Regeneración Ósea Guiada*

La regeneración ósea guiada (GBR, por sus siglas en inglés) es un tratamiento que genera tejido óseo nuevo mediante la utilización de una membrana que forma una barrera para proteger el área del defecto, de la invasión de otros tejidos en especial de tejido conectivo fibroso. El desarrollo de la GBR es una alternativa promisorio para el manejo de defectos óseos y fracturas. En los años recientes se ha puesto atención en las membranas de polímeros biodegradables y partículas inorgánicas bioactivas; esto es debido a que los polímeros sintéticos tienen propiedades adecuadas como la flexibilidad, buena capacidad de conformación y degradación. La combinación de estos materiales representa el mejor avance en términos de propiedades fisicoquímicas similares al hueso, con una excelente compatibilidad tisular, como son la afinidad celular, osteoinductividad y formación ósea [26]. La GBR es normalmente llevada a cabo con un injerto óseo, o con plasma rico en plaquetas. A pesar que este método induce autoregeneración del hueso, toma un considerable tiempo para obtener un volumen adecuado de hueso en la mayoría de los casos.

### *Distracción Osteogénica*

La distracción osteogénica es una técnica utilizada por los cirujanos ortopédicos para la reparación de defectos en huesos largos, sin el uso de materiales de injerto; se define como el proceso biológico de neoformación ósea entre dos segmentos vascularizados de un hueso fracturado. Esta técnica crea una fractura, espera la aparición de un callo óseo y posteriormente va separando controladamente los bordes de la fractura creando tensión en el callo óseo, con la consecuente formación de tejido óseo nuevo [27]. Esta práctica para la corrección de diversas deformaciones craneofaciales, ha sido estudiada en modelos animales, y ha demostrado la factibilidad de su aplicación en un número de sitios diferentes, incluida la mandíbula y el maxilar, así como la base craneal entre otros. Existen muchas ventajas de la distracción osteogénica por encima de la osteotomía convencional:

los tiempos quirúrgicos y la pérdida de sangre son reducidos, los injertos óseos no son necesarios y el hueso es estimulado y formado en conjunto con sus tejidos blandos y nervios adyacentes. Sin embargo, la distracción osteogénica tiene algunas desventajas asociadas a la técnica y al equipo quirúrgico, la inminente necesidad de una segunda intervención quirúrgica para la remoción de los aditamentos distractores [15], y los largos períodos de tiempo requeridos, en muchas ocasiones con presencia de dolor [2].

#### *Plasma Rico en Plaquetas (PRP)*

El plasma rico en plaquetas es un volumen de plasma autólogo, no tóxico, ni inmunorreactivo [28], que contiene una cuenta plaquetaria cinco veces mayor que la de la sangre, donde el número de plaquetas de un individuo sano oscila entre 150,000 y 450,000 plaquetas por  $\mu\text{l}$  de sangre. Las plaquetas se separan del plasma por centrifugación, se les mezcla con cloruro de calcio y trombina para la formación de un coágulo, el cual será colocado en la zona del defecto [29]. En el campo odontológico, el PRP ha sido utilizado en una variedad de aplicaciones como la elevación del piso del seno maxilar, el aumento del hueso alveolar, la reconstrucción mandibular, la reparación de la hendidura maxilar, el tratamiento de defectos periodontales, como relleno alveolar, entre otros; generalmente el PRP se le adiciona al hueso autólogo, mineral de hueso, o sustitutos orgánicos de hueso. Los factores de crecimiento presentes en el PRP contribuyen al proceso de curación o de regeneración ósea; entre los factores que han sido reportados se encuentran los siguientes: factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta ( $\beta\text{TGF}$ ), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento tipo insulina 1 y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF), además tres proteínas sanguíneas (fibrina, fibronectina y vitronectina) que son conocidas por actuar como moléculas de adhesión celular de osteoconducción [20].

#### *Proteína Morfogénica Ósea (BMP2)*

La proteína morfogénica ósea 2 (BMP2) juega un papel importante en el desarrollo del hueso y del cartílago; ha demostrado ser capaz de estimular la producción de hueso, de modo que actualmente se utiliza en cirugía ortopédica. La implantación de BMP2 en una

esponja de colágeno induce la formación de hueso nuevo y puede ser utilizado como tratamiento de ciertos defectos óseos [30]. Sin embargo estudios recientes la han asociado a la formación de calcificaciones no controladas, e incluso la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos de América (FDA) ha emitido una alerta contra su utilización [31].

### *Materiales Sintéticos*

Los inconvenientes asociados al uso de injertos óseos tradicionales han obligado al desarrollo de materiales sintéticos que puedan ser utilizados en la regeneración ósea. Entre las ventajas de éstos se puede mencionar que es posible controlar sus propiedades mecánicas y velocidad de degradación, dependiendo de la aplicación requerida. Estos polímeros son especialmente utilizados en ingeniería de tejidos debido a su potencial para la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular. Los polímeros sintéticos pueden procesarse en una gran variedad de estructuras porosas mediante prototipado (elaborados por computadora a través de un software y posteriormente impresos en tres dimensiones), electrohilado, separación de fases, porógenos, liofilizado, entre otros. Sin embargo, hasta este momento, algunos soportes hechos de polímeros sintéticos no muestran propiedades mecánicas adecuadas; esto representa una desventaja para las aplicaciones de ingeniería de tejidos. Una de las vías sugeridas para mejorar las propiedades de los soportes poliméricos y su desempeño es la elaboración de materiales compuestos a base de polímeros biodegradables y partículas a modo de relleno, como cerámicas bioactivas, la HA y los vidrios bioactivos (VB), o de materiales metálicos, por ejemplo el titanio.

Idealmente los materiales a utilizar como matriz deben poseer también otras características, incluyendo:

- Biodegradación
- Ambiente que favorezca la proliferación celular
- Osteoinducción
- Propiedades mecánicas similares al hueso
- Ser esterilizable

- Larga vida de anaquel
- Biocompatibilidad

La biocompatibilidad de un polímero está influenciada por distintos factores entre los cuales destacan: la presencia de grupos funcionales, la energía libre, su hidrofilia, cristalinidad y topografía superficial [10].

Algunos materiales poliméricos sintéticos utilizados en la fabricación de andamios en medicina regenerativa son [7,8]:

- Poli(ácido láctico) (PLA)
- Poli(ácido glicólico) (PGA)
- Copolímero de ácido láctico y ácido glicólico (PLGA)
- Hidrogeles
- Poliuretanos (PU)

#### **1.4. Poliuretanos Biodegradables**

Los poliuretanos son polímeros fabricados a partir de la reacción de diisocianatos con distintos polioles. Este tipo de polímeros se obtuvieron por primera vez en el año de 1937, por Otto Bayer, quien realizando pruebas de laboratorio en las que trataba de formular un componente químico con las propiedades del pegamento, descubre la espuma de poliuretano. El empleo generalizado de los poliuretanos se produjo durante la Segunda Guerra Mundial como sustituto del caucho, que era caro y difícil de obtener en aquella época. Sin embargo, la producción de poliuretano a escala industrial no se inició sino hasta 1952.

Los poliuretanos se han empleado como materiales para la construcción, espumas para aislamiento en refrigeración, sprays para sellado, aislamiento de tuberías de gas natural y tanques de combustible. Los campos de aplicación de las espumas flexibles se encuentran en las industrias fabricantes de asientos para coche, sillas y colchones; también se aplican para embalar equipos delicados y en artículos para hospitales. Como adhesivos, son

utilizados para cualquier aplicación que requiera resistencia a la abrasión, resistencia química, adhesión y también se han empleado como lacas, barnices, pinturas y esmaltes. Los aviones, ciertos equipos y maquinaria, así como ciertas estructuras son recubiertos con estas películas para protegerlos de los cambios bruscos de temperatura. También se han usado en suelas de zapatos, llantas de patines, partes automotrices, recubrimientos de cables, entre otras aplicaciones.

Por lo general, los PU se producen por condensación o por poliadición de un isocianato (di o polifuncional) con un poliol y otros reactivos como catalizadores, extensores de cadena, surfactantes, cargas, pigmentos, entre los más importantes. En cuanto a los isocianatos, éstos pueden ser aromáticos o alifáticos, y también pueden estar modificados; mientras que los polioles pueden ser de tipo poliéter, poliéster o tener estructura hidrocarbonada [32].

Por su versatilidad, los PU segmentados son candidatos importantes para aplicaciones biomédicas ya que los segmentos rígidos y flexibles pueden ser variados, lo que permite un mejor control estructural para las aplicaciones deseadas [33]. Los segmentos rígidos son producidos por la reacción entre el diisocianato y el extensor de cadena, y los segmentos flexibles los proporcionan los polioles de poliéster, poliéter o policarbonato [34].

Históricamente, los PU se han estudiado como biomateriales para el tratamiento de lesiones óseas desde finales de la década de los 1950's. Inicialmente fue utilizado en espuma, como cemento o pegamento óseo, para unir fracturas de huesos largos. Cuando fue probado en perros, se observó que mostraban biocompatibilidad [35]; desde entonces ya se hablaba de dichas propiedades, baja reactividad tisular al material implantado (que al menos no debería impedir o retrasar la reparación del hueso), baja toxicidad, facilidad de implantación quirúrgica, estabilidad dimensional y propiedades mecánicas similares a la zona de utilización. Aunque se reportó una actividad osteoblástica en la zona tratada y, la no reabsorción del PU, no se comprendía su metabolismo y excreción, además de que no se evidenciaban neoplasias ni toxicidad en los perros [35]. Sin embargo, este material tenía efectos tóxicos, que más adelante serían descubiertos.

Actualmente, las espumas de PU tienen algunas similitudes con el hueso esponjoso en aspectos estructurales y de comportamiento mecánico [36], adicionalmente, se ha logrado eliminar la toxicidad y algunas son altamente biocompatibles, incluso se han reportado técnicas de espumado *in situ* (o durante la polimerización), lo que representa un avance significativo al permitir la obtención de estructuras tridimensionales de volumen considerable [12,37]. Las espumas de PU pueden presentar poros interconectados, los cuales son deseables para que éstas sean utilizadas en ingeniería de tejidos; además son bioreabsorbibles permitiendo el reemplazo gradual del PU por la formación de tejido óseo nuevo [38].

Para la preparación de poliuretanos segmentados biodegradables tradicionalmente se han utilizado para el segmento flexible, polímeros con terminaciones hidroxilo, como polilácticos, poliglicólicos, policaprolactona, entre otros. Actualmente reciben mayor atención los aceites vegetales de fuentes renovables, debido a consideraciones ambientales y económicas. Los aceites vegetales son triglicéridos de ácidos grasos. La presencia de grupos éster en la estructura de los PU a base de aceites vegetales, los prepara para ser hidrolizados, proceso principal de su biodegradación [39].

### **1.5. Biodegradación de Poliuretanos para Aplicaciones Médicas**

Desde finales de los años 1950's se ha estudiado algunos poliuretanos para posibles aplicaciones biomédicas [35], debido a su biocompatibilidad, es decir a la capacidad que tienen de interactuar fisiológicamente en el cuerpo humano sin causar daño. Adicionalmente, para algunas aplicaciones específicas, se requiere que los poliuretanos sean degradados al interior del cuerpo humano y que los productos de degradación sean igualmente biocompatibles. Se ha demostrado que las vías de biodegradación de estos poliuretanos involucran enzimas secretadas por las células encargadas de la defensa inmunológica del cuerpo humano [40].

La biodegradación es un proceso que resulta del ataque de organismos vivos, o compuestos de organismos vivos, como por ejemplo bacterias, hongos, insectos, roedores, etc. El grado de biodeterioro depende de algunos factores como el medio ambiente, la presencia de aditivos en la composición y el tipo de material polimérico. La acción de los organismos vivos en el material, puede ocurrir de tres formas principales [41]:

- Efecto biofísico, en el cual la pérdida de resistencia mecánica del polímero favorece el crecimiento celular.
- Efecto bioquímico, en el que las sustancias producidas por los microorganismos afectan la estructura del polímero.
- La acción enzimática directa, en la cual las enzimas secretadas por los organismos vivos atacan los componentes del polímero, promoviendo rupturas oxidativas de los enlaces de la cadena principal.

Los poliuretanos segmentados utilizados en medicina regenerativa, usualmente deben ser diseñados para poseer tasas aceptables de biodegradación, de acuerdo a la velocidad de crecimiento del tejido que promueven, lo que representa una significativa diferencia con los poliuretanos bioestables utilizados en aplicaciones biomédicas [42].

Es importante considerar que los poliuretanos compuestos de diisocianatos alifáticos han mostrado tasas más rápidas de biodegradación que los compuestos de diisocianatos aromáticos [41]; y que algunos diisocianatos aromáticos han demostrado tener cierto grado de citotoxicidad.

Los poliuretanos segmentados biodegradables más frecuentemente utilizados para aplicaciones biomédicas generalmente se sintetizan utilizando un diisocianato, un poliol y un extensor de cadena. Usualmente, presenta una estructura compuesta por segmentos rígidos y segmentos flexibles; los segmentos flexibles se asocian con la estabilidad hidrolítica de los poliuretanos segmentado, aún que esto no es necesariamente cierto. Por otra parte, en principio, se supone que las enzimas no son capaces de degradar polímeros sintéticos, ya que estas degradan sustratos específicos; sin embargo, en la práctica las cosas son algo diferentes, tal como lo reporta Phua et al. [43], quien encontró que enzimas secretadas por las células asociadas a la respuesta inflamatoria son capaces de producir

degradación enzimática hidrolizando los enlaces uretano y urea. Los productos de dicha degradación son aminas libres y grupos hidroxilo.

Un estudio de Guelcher, reporta que los poliuretanos biodegradables para aplicaciones en medicina regenerativa pueden biodegradarse principalmente por dos vías: la hidrolítica, y la enzimática, generando productos de degradación *in vivo* no citotóxicos [42].

Los PU presentan una estabilidad limitada, a largo plazo, en medio fisiológico, ya que pueden ser hidrolizados química o enzimáticamente. Pueden ser degradados por procesos hidrolíticos catalizados por enzimas, así como por procesos oxidativos mediados por neutrófilos o macrófagos derivados de monocitos [44]. Estudios como el de da Silva *et al.*, reportan que los PU a base de policaprolactona (PCL) y polietilenglicol (PEG) son biodegradados en medios *in vitro*, en un periodo de 38 semanas en condiciones fisiológicas simuladas. Los enlaces éster de los segmentos flexibles fueron los principalmente degradados, induciendo movilidad de cadenas de bajo peso molecular, para formar estructuras cristalinas. Los productos de degradación de los PU, demostraron ser biocompatibles en pruebas de viabilidad celular con cultivos celulares [44].

Otro estudio, menciona que la biodegradación de los PU se consigue mediante la incorporación de enlaces hidrolizables en la cadena polimérica; generalmente estos enlaces se encuentran presentes en los segmentos flexibles.

El aceite de ricino, compuesto principalmente de ácido ricinoléico, un aceite vegetal. La presencia de grupos éster en la estructura de los PU a base de aceites vegetales, los prepara para ser hidrolizados. Sorprendentemente existen pocos estudios que reporten el proceso de biodegradación de estos materiales; según Yeganeh [39], quien realizó un estudio en el cual se determinó la biodegradación de PU a base de una combinación de prepolímeros de aceite de ricino y de polietilén glicol, en el cual concluye que los productos de la biodegradación por hidrólisis de estos PU son no citotóxicos por pruebas de supervivencia de células fibroblásticas [39].

## **1.6. Poliuretanos Biodegradables a Base de Aceite de Ricino**

El aceite de ricino (CO por sus siglas en inglés, castor oil), compuesto principalmente de ácido ricinoléico, es un aceite vegetal, que a diferencia de la mayoría, no requiere ser funcionalizado para poder ser utilizado en reacciones poliméricas [39,41].

En 2015, Li *et al.* reportaron haber obtenido espumas biocompatibles de poliuretanos a base de CO, con resistencia a la compresión de hasta 2 MPa y módulos elásticos de 48 MPa, en pruebas mecánicas [45].

Un estudio *in vivo*, analizó la biocompatibilidad de un polímero a base de CO y nano partículas de sílice como material de relleno, en ratas hasta por 60 días. Concluyó que el polímero fue biocompatible para la regeneración de defectos óseos, comportándose como un marco receptivo que facilita la formación ósea y es capaz de promover la inducción de células osteoprogenitoras. La presencia de células osteoprogenitoras sugiere capacidad de osteoinducción de sílice [46].

Otro estudio *in vivo*, evaluó la biocompatibilidad de poliuretano a base de CO, en tibias de conejos, hasta por 150 días post-implante, estudiadas por cortes histológicos y tomografías computarizadas, y reportó que dichos materiales fueron biocompatibles, y que desde los 90 días post-implante, existe depósito de sustancia ósea inmadura sobre la superficie del material implantado, y este depósito va aumentando su maduración ósea con el tiempo [47].

## **1.7. Espumas de Materiales Compuestos a Base de Poliuretano Biodegradable**

Espumas de materiales compuestos a base de poliuretanos segmentado biodegradables han sido estudiadas para aplicaciones en medicina regenerativa de tejido óseo. Para este propósito, partículas de relleno pueden ser incorporadas durante la síntesis del polímero o mediante mezclado físico utilizando el PU previamente disuelto. En este material

compuesto se puede generar la porosidad adecuada utilizando un método de extracción de sales o produciendo espumas químicas mediante la incorporación de agua durante la polimerización. Un material que presente potencial, para su uso en regeneración ósea, debería exhibir una marcada habilidad de favorecer la adhesión y proliferación de células osteoblásticas, así como presentar alguna influencia sobre la diferenciación de celular. Adicionalmente, se espera que la incorporación de las partículas en la matriz de PU se espera que produzca un efecto favorable de refuerzo en las propiedades mecánicas del polímero.

La literatura reporta la fabricación de espumas de material compuesto de PU y vidrio bioactivo (VB) con porosidad mayor al 70%, presentando poros interconectados de entre 100 y 400  $\mu\text{m}$ , y paredes con microporos menores a 10  $\mu\text{m}$  [9]. Esta estructura porosa satisface los requerimientos de estructuras de soporte para aplicaciones de ingeniería tisular ósea. Las espumas de material compuesto mostraron un módulo elástico mayor que las espumas de PU sin relleno. Las espumas de PU/VB representan una familia importante de soportes con aplicaciones potenciales en la ingeniería de tejido óseo [9].

Otro estudio reporta haber obtenido espumas de poliuretanos segmentados hasta con 10% de nano partículas de vidrio bioactivo, que actúan como refuerzo para mejorar sus propiedades mecánicas, incrementando su módulo elástico. Menciona que a pesar de que las propiedades mecánicas de estos materiales compuestos aún se encuentran por debajo de las propiedades mecánicas del hueso esponjoso, sí cumplen con los requerimientos necesarios para favorecer el crecimiento y la proliferación celular; las muestras formaron una capa de HA al ser acondicionadas en fluido corporal simulado (FCS). Como una característica adicional, mencionan que estas espumas son de fácil manejo quirúrgico, pues pueden ser adaptadas anatómicamente a la morfología del sitio de implantación [48].

## 1.8. Titanio como Biomaterial

El titanio es un biomaterial metálico que es considerado una de las mejores opciones para el reemplazo óseo [49,50], especialmente en la región maxilo-mandibular [51]; también ha sido utilizado como sustituto óseo en la articulación temporomandibular [52]. El Ti se ha empleado ampliamente como sustituto de huesos largos [53], incluso, como soporte de membranas de regeneración ósea guiada, entre otras aplicaciones.

Las ventajas del Ti, y sus aleaciones de grado médico, se han asociado al excelente comportamiento *in vivo*, debido al buen balance entre sus propiedades mecánicas, fisicoquímicas y biofuncionales [50]. Entre sus desventajas, que comprometen el uso de Ti como biomaterial, está la diferencia entre los módulos elásticos del Ti y del hueso, lo que produce una concentración de esfuerzos, favoreciendo la resorción o pérdida ósea alrededor del material [54]. A pesar de su capacidad de osteointegración, el Ti es rodeado por tejido fibroso posterior a su implantación, provocando un efecto indeseable al no permitir la interacción directa del Ti con las células y el tejido óseo [50].

El Ti ha sido utilizado también en la fabricación de soportes para ingeniería de tejido óseo (ver figura 1.2) [55,56], y probado con diferentes recubrimientos para mejorar su interacción con el medio biológico como lo reportan diversos estudios [51]. Otros estudios reportan haber hecho esfuerzos por reducir la rigidez del Ti a niveles del hueso cortical, utilizando diversas técnicas como la creación de materiales porosos de Ti, o aleaciones como la de níquel-titanio (NiTi) para ayudar a reducir las cargas [52]; también se han hecho estudios que demuestran que materiales porosos de Ti con NaCl como porógeno presentan buena proliferación y adhesión celular, como en el estudio de Torres *et al.* [52], en el cual se estudian las condiciones adecuadas para la confección de los andamios de Ti. Sin embargo, en ese mismo trabajo se menciona que el porcentaje de porosidad debe ser controlado para reducir la rigidez del implante sin afectar sus propiedades mecánicas; esto se logra variando la temperatura de sinterización, la fuerza de compresión y la utilización de diferentes espaciadores como porógenos para la manufactura del soporte [50].

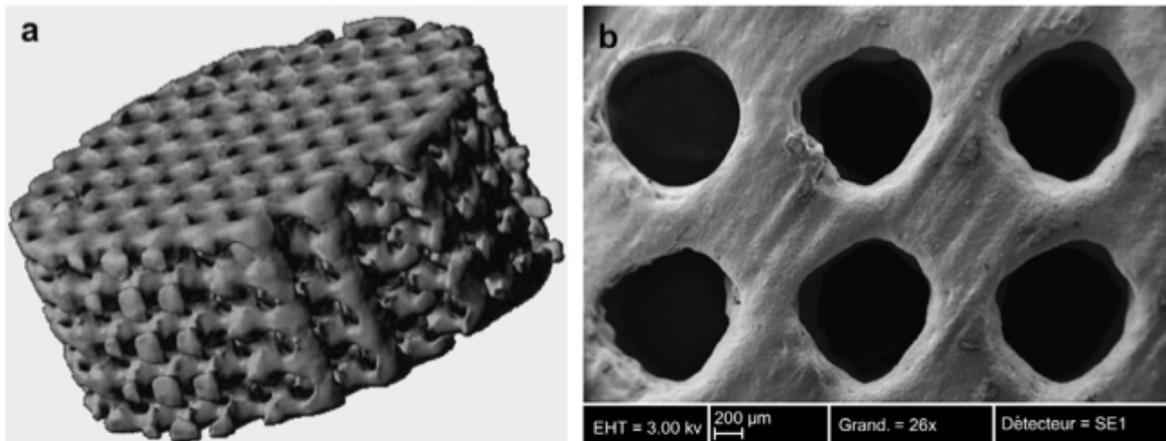


Figura 1.2. a) Prototipo de un soporte de titanio para ingeniería tisular, y b) Imagen SEM del soporte de titanio a 25x [56].

Así mismo, el Ti ha sido utilizado con éxito como agente de refuerzo en biomateriales compuestos [12,37,57–60], principalmente en aplicaciones de ingeniería de tejido óseo, en los cuales se ha reportado que favorece la mineralización. Cabe mencionar que la mayoría de los trabajos publicados utilizan el titanio en forma de dióxido de Titanio ( $\text{TiO}_2$ ) [61–65].

### 1.9. Tratamiento Superficial de Partículas de Titanio

Las partículas de titanio para fines de regeneración ósea pueden ser funcionalizadas superficialmente, bien con la finalidad de mejorar la integración a la matriz polimérica, o para mejorar la integración al tejido óseo. La literatura reporta que en algunos casos las partículas de titanio fueron acondicionadas en su superficie con silano, para permitir una buena interacción entre la partícula y los materiales poliméricos, como el poliuretano [66]. Así mismo, se ha reportado que grupos de ácido fosfónico o fosfonato se pueden unir de manera estable a los óxidos metálicos, tales como el óxido de titanio [67–71].

Algunos autores reportan la utilización de tratamientos superficiales para permitir al Ti tener una mejor integración al tejido óseo, ya que las formas convencionales de titanio para implantes, frecuentemente son encapsuladas por tejido fibroso, aislando el titanio del hueso, lo que en ocasiones derivan en la pérdida del implante. La funcionalización de la superficie

del titanio ha demostrado ser eficiente, ya que produce una mejor interacción química con proteínas adhesivas del cuerpo que modulan la respuesta biológica [72].

También se reporta haber mejorado la adhesión celular a las partículas de titanio, funcionalizando la superficie del implante de titanio mediante el tripéptido de L-arginina, glicina y L-ácido aspártico (RGD por sus siglas en inglés) [73]. Así mismo, las investigaciones sugieren la funcionalización de la superficie de las partículas de titanio mediante un lavado con una solución ácido-oxidativa (HCl-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 50%-50% v/v al 30% en agua destilada) [72], con la finalidad de activar la superficie de las partículas de titanio, al tiempo que se eliminan posibles restos de la síntesis y contaminantes.

A continuación se enlistan algunos otros métodos de modificación superficial del titanio: métodos mecánicos: mecanizado, pulido, molienda y voladura; métodos físicos: pulverización térmica (de flama o de plasma), depósito físico por vapor, descarga luminiscente, implantación y depósito iónico; métodos químicos: tratamiento ácido, tratamiento alcalino, tratamiento oxidativo, sol-gel, oxidación anódica, bioquímica, depósito químico por vapor [74].

### **1.10. Biomateriales Compuestos de PU y Ti**

Materiales compuestos de poliuretano y titanio han sido obtenidos, y caracterizados para su utilización como recubrimientos [62,63]; en algunos casos se reporta la necesidad de acondicionar la superficie con un silano para permitir una buena interacción entre estos materiales [66].

El trabajo de Zhang *et al.* (2008) describe propiedades antimicrobiales de materiales compuestos de poliuretano y titanio, bajo ciertas radiaciones ultravioleta [75].

El estudio de Pareta *et al.* (2010) reporta la buena adhesión de osteoblastos a estructuras de titanio recubiertas de PU [53], y el estudio de Sakamoto *et al.* (2007) reporta una buena

resistencia de adhesión de los materiales de estructuras de titanio recubiertas de poliuretano [59]; sin embargo en ambos casos los materiales estudiados fueron estructuras de titanio recubiertas de poliuretano. Por otro lado, Da Silva *et al.* (2013) reportaron haber obtenido materiales compuestos de poliuretano y titanio por polimerización *in situ*, y concluyeron que los materiales compuestos mostraron mejores propiedades mecánicas y térmicas que el poliuretano puro [12]; sin embargo el trabajo no hace referencia a la biocompatibilidad de dichos materiales compuestos.

### **1.11. Mecanismo de Biocompatibilidad del Ti con las Células**

El titanio se considera inerte en el cuerpo humano ya que no presenta corrosión superficial ni reacciones en el cuerpo al ser implantado. En el cuerpo humano, el hueso exhibe una buena cicatrización en torno al titanio, ya que específicamente no produce una reacción a cuerpo extraño, encapsulamiento o signos de inflamación crónica, característicos de materiales implantados en el cuerpo [76]. El titanio tratado superficialmente, con una capa apatítica, cicatriza en el hueso sin encapsulamiento, y uniéndose estrechamente con el hueso [55,77,78]. El titanio puro ocasiona que el hueso cicatrice en una posición cercana al titanio, pero no se adhiere a él, ya que se forma una capa biológica de entre 5 y 10 nm de espesor que separa al titanio del hueso [79].

La superficie de titanio posee la capacidad de adsorber diversas proteínas como glucosaminoglucanos, colagenasa, fibronectina, fibrinógeno, entre otros. El titanio puede también permitir el crecimiento y la diferenciación celular. Una explicación para este proceso podría ser que los neutrófilos y monocitos son los primeros en migrar a la superficie del titanio; posteriormente acuden macrófagos como parte de la respuesta inflamatoria, los cuales activados forman células gigantes, seguidamente las células progenitoras migran al sitio del implante y se diferencian en osteoblastos que producen hueso, este proceso puede ser potenciado por la proteína morfogenética ósea [79]. Diversos trabajos han sido publicados sobre las interacciones celulares con las superficies del titanio

tanto en adhesión *in vitro*, como curación *in vivo* [15,49,51,80]. Por lo anterior, algunos autores sugieren la posibilidad de la formación de un complejo titanio-proteína, lo que potencializa su biocompatibilidad, aún que estos complejos aún no han sido propiamente aislados, caracterizados o demostrados [79].

### **1.12. Hidrofilia de los Materiales Compuestos de PU/Ti**

La hidrofilia superficial de los materiales ha sido reportada como determinante en la capacidad de las células para adherirse a dichos materiales, por lo que, se han realizado múltiples esfuerzos, mediante tratamientos físico-químicos a las superficies de contacto, para permitir a las células tener una mejor adhesión.

Los materiales compuestos de policaprolactona (PCL) y partículas de titanio reportados en la literatura, han presentado baja adhesión celular a tiempos prolongados, debido a la alta hidrofobicidad de la PCL, y a pesar de la hidrofiliidad asociada al Ti [58].

Igualmente, soportes de PCL o de PU a base de PCL, utilizados para medicina regenerativa han encontrado su principal limitación debido a la baja energía superficial del material, lo cual impide la migración celular al soporte, así como la adhesión, proliferación y viabilidad, limitando la biocompatibilidad del soporte [81].

Estudios muestran que las partículas de titanio en escala micro presentan una tendencia a tener ángulos de contacto mayores que las partículas en escala nano, esto se explica por la menor presencia de defectos superficiales en las partículas de escala micro que en las de escala nano, las cuales presentan una mayor superficie y mayor cantidad de defectos superficiales. Así mismo se ha reportado que partículas de titanio en escala nano presentan una mejor adsorción de proteínas hidrofílicas [53].

### **1.13. Pruebas Biológicas con Células Troncales de Pulpa Dental Adulta Humana**

Las células troncales humanas han sido ampliamente utilizadas como medio de verificación de biocompatibilidad para diversos materiales que se presumen biológicamente compatibles. Las técnicas de aislamiento de estas células han llevado a la cavidad oral, resultando en el linaje osteoblástico pretendido para el presente estudio, ya que los osteoblastos se derivan de un tejido embrionario común con el tejido de la pulpa dental adulta humana [6,82]. Adicionalmente, se ha reportado que estas células troncales de pulpa dental humana son capaces de formar un complejo pulpa-dentina y/o cemento-ligamento periodontal y estimular la regeneración ósea en el complejo craneofacial [15,83]. Por lo anterior, las células troncales de pulpa dental humana (CTPDH) han sido utilizadas para las pruebas celulares de diferentes biomateriales con fines osteocompatibles, como el titanio [83–85]. En 2006, Zhang *et al.* reportaron que las CTPDH fueron más capaces de generar un depósito de tejido duro (hueso) que las células troncales de médula ósea [85]; En 2010, Mangano *et al.* reportaron estudios con CTPDH sobre superficies de titanio preparadas con distintos tratamientos, haber obtenido diferenciación osteoblástica a partir de dichas células [84]. Incluso en publicaciones previas del grupo de colaboradores han sido utilizadas exitosamente sobre películas de poliuretano y biocerámicos [11,86].

## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Partículas de Titanio

#### **Materiales**

Partículas de polvo de titanio grado 4 c.p. (comercialmente puro) fabricados por un proceso de hidrogenación /deshidrogenación fueron utilizadas. De acuerdo al fabricante, SE-JONG Materials Co. Ltd. (Seúl, Corea del Sur) la distribución del tamaño de partículas menores a 9.7  $\mu\text{m}$  es de 10%, 23.3  $\mu\text{m}$  es de 50% y 48.4  $\mu\text{m}$  es de 90%, y con una composición química equivalente a titanio grado 4 c.p. de acuerdo a la norma ASTM F67-00. Dichas partículas de titanio fueron proporcionadas por los doctores José Rodríguez y Yadir Torres de la Universidad de Sevilla, España y por el Dr. Juan José Pavón Palacio†, en la Universidad de Antioquia en Medellín, Colombia.

#### **Métodos**

##### *2.1.1. Caracterización de las Partículas de Titanio*

##### Tamaño de Partícula

La distribución del tamaño de partícula del titanio fue confirmada con una suspensión de las partículas en agua destilada, utilizando un analizador de tamaño de partícula por difracción laser (LD), Beckman Coulter LS100Q. Este equipo tiene un intervalo de operación de 0.4 a 900 micras por lo que adicionalmente se determinó la distribución del tamaño de las partículas de titanio mediante dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés) en un equipo Malvern Zetasizer Nano ZEN3600 en el en el Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales, Cinvestav-IPN, Unidad Mérida.

##### FTIR

Las partículas de titanio fueron analizadas por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) utilizando reflectancia total atenuada (ATR) con cristal de ZnSe. Los espectros fueron obtenidos en el intervalo espectral de 4000–650  $\text{cm}^{-1}$ , con 100 barridos y resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ , empleando un espectrofotómetro con transformada de Fourier de Nicolet modelo Thermoscientific Nicolet 8700.

## Raman

Los espectros Raman de las partículas de titanio fueron obtenidos mediante un espectrómetro inVia Renishaw. El sistema obtuvo datos en un intervalo espectral entre  $3300\text{ cm}^{-1}$  y  $100\text{ cm}^{-1}$ . La fuente de radiación de excitación utilizada fue un láser de argón de 633 nm con una potencia de 100%, y 5 acumulaciones.

## MEB

La morfología de las partículas fue definida mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) utilizando un microscopio JEOL JSM 6360LV con un voltaje de aceleración de 20 kV. Las muestras de las partículas no requirieron de algún recubrimiento para ser observadas y analizadas.

## EDX

La composición elemental de las partículas de titanio fue obtenida mediante microanálisis por energía dispersiva de Rayos X (EDX por sus siglas en inglés). Para este fin se empleó un equipo X-sight Model 7582 de Oxford Instruments, acoplado al MEB utilizando un haz de 20 keV.

## DRX

Los difractogramas de rayos X de las partículas de titanio fueron obtenidos en un difractor Siemens D5000, con radiación  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1.5416\text{ \AA}$ ), con un tamaño de paso de  $0.02^\circ$  y un tiempo de conteo de 3 s, en el intervalo  $2\theta$  de  $5^\circ$  a  $60^\circ$ .

## XPS

Para la validación de la composición química de las partículas de titanio se realizó el análisis por espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS, por sus siglas en inglés) con un equipo Thermo Scientific K-Alpha X-ray Photoelectron Spectrometer con una fuente monocromática de  $\text{Al K}\alpha$  con una energía de 1486.6 eV. Las muestras se corrieron sin erosión (0 s) y con 30 s de erosión con iones de Argón (Ar). Se bajó la presión hasta  $5\text{e-}9$  mbar, y se aplicó compensación de cargas estáticas con un haz de iones de Ar, lo que eleva la presión hasta  $1\text{e-}7$  mbar. El área elíptica de análisis tuvo un diámetro mayor de 0.4 mm. Posteriormente, se realizó la deconvolución de los picos principales para la determinación

de su composición elemental mediante el uso de la función “deconvolute” del software Origin de Origin Lab Inc.

### *2.1.2. Tratamiento Superficial de las Partículas de Titanio*

Las partículas de titanio fueron activadas con un tratamiento superficial que consistió en una inmersión con agitación magnética, durante 5 min en una solución acuosa al 30% de una mezcla de HCl y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50-50%, v/v). Posterior a la inmersión, las partículas fueron lavadas en agua destilada con agitación magnética por 15 min; este paso fue repetido 3 veces para eliminar los restos de la solución activadora. Posteriormente, las partículas de titanio activado fueron secadas en una estufa de vacío a 100°C por 24 h con presión reducida.

Posteriormente, para determinar la composición química de las partículas de titanio tratadas químicamente, y su estado de oxidación, se realizó un análisis por XPS de las superficies de las partículas de titanio tratadas, siguiendo la metodología descrita anteriormente. Adicionalmente, se realizó la deconvolución de los picos principales.

## 2.2. Materiales Compuestos de Poliuretano y Titanio en Forma de Película

### Materiales

Los reactivos utilizados fueron:

Policaprolactona diol (PCL), peso molecular promedio 2,000 g/mol (Aldrich, CAS 36890-68-3)

4,4-metilen-bis ciclohexil diisocianato (HMDI) (Aldrich, CAS 5124-30-1)

Octanoato de estaño (Sigma, CAS 301-10-0)

L-Glutamina (GLU) (Sigma, CAS 56-85-9)

N, N-Dimetilformamida (DMF) (Sigma-Aldrich, CAS 68-12-2)

Cloroformo (Sigma-Aldrich, CAS 67-66-3)

### Métodos

#### 2.2.1. Síntesis de Poliuretano y Obtención de Películas

La síntesis del poliuretano segmentado biodegradable se llevó a cabo utilizando como segmento flexible la policaprolactona diol, y como segmento rígido el 4,4-metilen-bis ciclohexil diisocianato y L-glutamina como extensor de cadena. El octanoato de estaño al 0.3% fue utilizado como catalizador. Los poliuretanos segmentados fueron obtenidos en proporciones molares de 1:2.05:1.05 para PCL:HMDI:GLU.

Esta reacción se realizó mediante una polimerización en dos pasos en una cámara con atmósfera de nitrógeno, y un reactor provisto de agitación mecánica y temperatura de 60°C.

El primer paso de la reacción consistió en la preparación de un prepolímero, por medio de la reacción de la policaprolactona diol con el 4,4-metilen-bis ciclohexil diisocianato en proporción 1:2.05 y 0.3% de octanoato de estaño como catalizador, en disolución de dimetilformamida. La mezcla se hizo reaccionar bajo agitación constante durante 4 horas en atmósfera de nitrógeno a 60 °C.

En el segundo paso, el prepolímero obtenido reaccionó con cantidades equimolares del extensor de cadena, esto es, L-glutamina. Para agregar el aminoácido, éste fue disuelto en DMF, y fue necesario acidular la solución con ácido clorhídrico para lograr que el

aminoácido se disolviera. La reacción de extensión de cadena se llevó a cabo bajo agitación constante por 2 horas en atmosfera de nitrógeno a 60 °C.

Una vez terminada la polimerización, el producto se precipitó en agua destilada fría para detener la reacción, se dejó reposar por 24 horas y posteriormente fue lavado 3 veces con agua destilada para eliminar los residuos monoméricos. El precipitado obtenido se secó a presión reducida a 60 °C por 24 horas.

Películas del poliuretano fueron obtenidas disolviendo el polímero en un volumen de disolvente según se indica en la tabla 2.1. Esta solución polímero/cloroformo fue vertida en un molde de teflón y evaporando a temperatura ambiente (25 °C), por un mínimo de 24 horas.

Los materiales compuestos en forma de películas, se obtuvieron mediante la disolución del polímero en cloroformo a agitación constante. Las partículas de Ti, previamente secadas a presión reducida a 100 °C durante 12 horas, fueron suspendidas mediante agitación durante 5 minutos y posteriormente colocado en un baño de ultrasonido durante 15 minutos para favorecer su dispersión homogénea. La suspensión del Ti y la solución del polímero fueron mezcladas, de tal manera que se consiguieran concentraciones titanio/polímero de 1, 3 y 5% p/p (ver tabla 2.1). Inmediatamente después, se colocó en un baño de ultrasonido durante 15 minutos adicionales. A continuación la mezcla fue vertida en un molde de teflón y finalmente se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente (25 °C) por un mínimo de 24 horas.

Tabla 2.1. Cantidades utilizados para la preparación de las películas de SPU-G/Ti.

Película	Disolución de Polímero		Suspensión de BV	
	SPU-G (mg)	Cloroformo (ml)	Titanio (mg)	Cloroformo (ml)
SPU-G	2000	30	-	-
SPU-G/1% Ti	1980	20	20	10
SPU-G/3% Ti	1940	20	60	10
SPU-G/5% Ti	1900	20	100	10

### *2.2.2. Caracterización Fisicoquímica de las Películas de SPU-G/Ti*

Los espectros de infrarojo y Raman, la morfología mediante MEB, los difractogramas por DRX y el XPS fueron obtenidos como se mencionó en el apartado 2.1.2.1. Las muestras para el MEB fueron previamente recubiertas con oro para su observación.

#### Distribución de partículas de titanio mediante EDX

Para la observación de la distribución de las partículas de titanio en los materiales compuestos, se realizó un mapeo para titanio por EDX, durante 300 s con un voltaje de aceleración de 20 kV. Las muestras analizadas fueron previamente recubiertas con oro para su observación.

#### TGA

La temperatura de descomposición ( $T_d$ ) y el contenido final de titanio de los materiales se obtuvo mediante análisis termogravimétrico (TGA) con un equipo TGA-7 Perkin Elmer. Las muestras fueron calentadas de 50° a 650 °C con una tasa de calentamiento de 10° C/min, bajo atmósfera de nitrógeno. Se reporta la masa residual contra temperatura y la primera derivada de la masa residual contra temperatura.

#### DMA

El posible desplazamiento en la temperatura de transición vítrea o relajación alfa ( $T_g$ ) del PU se determinó mediante análisis mecánico dinámico (DMA); los ensayos de DMA se realizaron con un equipo Perkin-Elmer modelo DMA-7, en modo de tensión, para las películas de los materiales de SPU-G y titanio; las muestras se analizaron en un intervalo de temperatura de -100° a 150 °C a una frecuencia de 1 Hz, una rampa de calentamiento de 5 °C/min y un promedio de carga estática de 90 y dinámica de 70 mN. Las muestras para dichas pruebas fueron rectángulos de 5 mm de ancho por 20 mm de largo por 0.1 mm de espesor.

#### DSC

Se realizó un análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un equipo DSC-Diamond de Perkin Elmer, para la posible observación de alguna transición de baja temperatura en los materiales, ya sea su temperatura de fusión ( $T_m$ ), la temperatura de

transición vítrea ( $T_g$ ), o cualquier otra, correspondientes a los segmentos rígidos o a los flexibles, del SPU-G. Para esto, fueron utilizados de 5 a 7 mg de muestra de cada material y se calentaron entre  $-5^\circ$  y  $150^\circ\text{C}$  bajo una tasa de calentamiento de  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  y atmósfera de nitrógeno.

## SAXS

Análisis de dispersión de rayos X a bajos ángulos (SAXS por sus siglas en inglés) fue realizado a las películas de SPU-G y materiales compuestos de SPU-G y Ti, para determinar la distancia interlamelar ( $L$ ) existente entre los segmentos rígidos de los materiales, con la finalidad de estudiar el comportamiento de los arreglos nanométricos del polímero, y su posible modificación con la inclusión de las partículas de Ti. Muestras en forma de películas delgadas (0.1 mm de espesor) se analizaron a temperatura ambiente ( $20^\circ\text{C}$ ) en modo de transmisión, utilizando un equipo de dispersión de rayos-X de ángulo pequeño de alta resolución Xeuss (SAXS) de XENOCS, con radiación  $K\alpha$  (Cu), longitud de onda de  $\lambda_{\text{Cu}} = 0.15411$  nm, y un detector en dos dimensiones (2D, Pilatus 300K).

Para el cálculo de  $L$  se aplicó la ecuación 1, a partir de la gráfica de  $Q^2I$  contra  $Q$ . Los datos obtenidos por el equipo son valores de intensidad ( $I$ ) con respecto a  $Q$ .

$$L = 2\pi / Q_{\text{max}} \quad \text{Ec. 1.}$$

Donde  $Q_{\text{max}}$  es el valor de  $Q$  en el pico de la curva formada al graficar  $Q^2I$  contra  $Q$ , a partir de los datos obtenidos por el equipo.

## Porcentaje de Cristalinidad

Los porcentajes de cristalinidad de los materiales de SPU-G y materiales compuestos de SPU-G y titanio fueron calculados a partir de los análisis de DSC y DRX, de acuerdo a la metodología descrita a continuación.

La cristalinidad de los materiales de SPU-G y titanio se determinó calculando la entalpía de fusión a partir del análisis DSC, utilizando la ecuación 2.

$$X_c^{\text{DSC}} = \Delta H_f / (W_{ss} \times \Delta H_f^\circ) \times 100 \quad \text{Ec. 2.}$$

Donde  $X_c^{DSC}$  es el porcentaje de cristalinidad por DSC,  $\Delta H_f$  es la entalpía de fusión del material, obtenida como el área bajo la curva del pico atribuido a la fusión de la porción cristalina del material,  $W_{ss}$  es la fracción teórica de la masa del segmento flexible del material (para SPU-G,  $W_{ss} = 0.749$ ), y  $\Delta H_f^\circ$  es la entalpía de fusión de la PCL 100% cristalina reportada en  $136 \text{ J g}^{-1}$  [87].

El porcentaje de cristalinidad por DRX se calculó utilizando el difractograma de DRX, trazando una línea base horizontal de extremo a extremo del escaneo, en la gráfica de intensidad contra  $2\theta$ . Posteriormente, se calcula el área bajo la curva total del material incluidas la parte amorfa y la semicristalina; a continuación, se calculó el área bajo la curva de los picos atribuidos a las fases cristalinas y se aplicó la ecuación 3.

$$X_c^{DRX} = A_c / (A_a + A_c) \times 100 \quad \text{Ec. 3.}$$

Donde  $X_c^{DRX}$  es el porcentaje de cristalinidad por DRX,  $A_c$  es el área bajo la curva de la zona cristalina (los picos en la gráfica de DRX), y  $A_a$  es el área bajo la curva de la porción amorfa del material.

### Ángulo de Contacto

Los ángulos de contacto fueron medidos utilizando el método de gota estática (ver figura 2.1) con tres diferentes líquidos. Las pruebas se realizaron en un Contac Angle Meter, marca Tantec, a temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; una gota de  $1 \text{ } \mu\text{l}$  de cada líquido utilizado, fue depositada sobre la superficie del material a estudiar utilizando una micro jeringa calibrada (Hamilton). La medición fue realizada utilizando la regla de medición del equipo sobre la imagen de proyectada de la gota en un fondo calibrado con un transportador, a los 10 s después de depositada la gota sobre la superficie del material. Los líquidos utilizados fueron agua desionizada, buffer fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) y medio de cultivo celular DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) bajo en glucosa (Biowest), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biowest). La prueba incluyó la medición sucesiva de 3 gotas para cada material, para cada uno de los líquidos. Los resultados son reportados como la media de las 3 mediciones, y su desviación estándar. Adicionalmente, se realizaron pruebas utilizando yodometano (Sigma-Aldrich), en las cuales el líquido

depositado se extendía sin formar gota, debido probablemente a un efecto de disolución del material.



Figura 2.1. Medición del ángulo de contacto mediante el método de gota sésil.

### 2.2.3. Caracterización Mecánica de las Películas de SPU-G/Ti

Las pruebas mecánicas de tensión se realizaron a las películas del SPU-G puro y de los materiales compuestos, con el fin de determinar su módulo de elasticidad ( $E$ ), esfuerzo a tensión al límite elástico ( $\sigma_{yield}$ ), esfuerzo a la ruptura ( $\sigma_{break}$ ), esfuerzo máximo ( $\sigma_{max}$ ), porcentaje de elongación al límite elástico ( $\epsilon_{yield}$ ) y a la ruptura ( $\epsilon_{break}$ ). Dichas pruebas se realizaron según la norma ASTM D882, usando una máquina de pruebas universales MINI SHIMADZU con una celda de carga de 1 kN. Para el mejor entendimiento del comportamiento mecánico de las películas a tensión se utilizaron dos velocidades de desplazamiento del cabezal; una de baja tasa de deformación a 50 mm/min y otra de alta tasa de deformación de 250 mm/min. La prueba de tensión consistió en colocar la probeta

entre dos mordazas, una fija y otra móvil sujeta al cabezal de la máquina de pruebas universales, con una distancia entre mordazas inicial de 25 mm. Se utilizaron probetas cortadas en forma de rectángulo, con un tamaño de 5 mm de ancho, 40 mm de largo, y 0.1 mm de espesor, siguiendo las proporciones indicadas en la norma. La carga fue aplicada hasta que el material falló. Fueron probadas al menos cinco muestras ( $n \geq 5$ ) para cada material ensayado.

#### 2.2.4. Pruebas de Degradación *in vitro* de las Películas de SPU-G/Ti

Las pruebas de degradación *in vitro* se realizaron por reflujo a 100 °C durante 24 horas en soluciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, HCl 2M, NaOH 5M, NaClO al 6%, utilizando agua destilada como control. Para estos ensayos se colocaron por triplicado aproximadamente 50 mg del SPU-G y de los materiales compuestos en cada solución. Los residuos de la degradación fueron lavados y secados a temperatura ambiente (25 °C) por un mínimo de 48 h; se realizó el cálculo de porcentaje de pérdida de masa mediante la ecuación 4.

$$\% \text{ Masa Perdida} = [(m_i - m_f) / m_i] \times 100 \quad \text{Ec. 4.}$$

Donde  $m_f$  es la masa final de la muestra después de la degradación y  $m_i$  es la masa inicial de la muestra previa a la degradación.

#### 2.2.5. Ensayos de Citotoxicidad de las Películas de SPU-G/Ti

Pruebas de viabilidad y proliferación fueron realizadas utilizando células troncales de pulpa dental humana y osteoblastos de ratón. Previamente a los ensayos, las películas de los materiales de SPU-G, SPU-G/1% Ti, SPU-G/3% Ti, SPU-G/5% Ti fueron esterilizadas con luz ultravioleta durante 20 min por cada lado. Las pruebas celulares se realizaron por quintuplicado y, pozos sembrados con células únicamente fueron utilizados como controles positivos; no fueron utilizados controles negativos. Los resultados de las pruebas celulares se reportan como porcentaje de la absorbancia respecto a los controles celulares para cada tiempo de incubación. Pruebas de análisis de la varianza (ANOVA) fueron realizados para las pruebas celulares, siguiendo la metodología descrita en la sección 2.4.

### Aislamiento y Cultivo de Células Troncales de Pulpa Dental Humana

Para los ensayos de biocompatibilidad, pulpa dental humana fue extraída, bajo consentimiento informado, por extracción dental rutinaria del tercer molar de pacientes entre 16 y 20 años de edad. Células troncales de pulpa dental humana (CTPDH) fueron aisladas de la pulpa dental extraída, como se describe en la literatura con algunas modificaciones [88]. El tejido de pulpa dental fue cortado en porciones pequeñas, y luego lavado con PBS de Biowest para separar la porción sanguínea antes que el tejido fuera sumergido en una solución de colagenasa al 1% (Sigma-Aldrich) e incubado por 30 min a 37 °C, y posteriormente fue centrifugado a 1000 rpm para obtener las células. Las células fueron resuspendidas en medio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) bajo en glucosa (Biowest), suplementado con 10% de suero fetal bovino y penicilina-estreptomicina al 1% (Sigma-Aldrich). Las células fueron cultivadas en cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (Nunclon™) a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> en una atmósfera humidificada. El medio fue cambiado dos veces por semana durante la expansión. Posteriormente, cuando las células alcanzaron confluencia, alrededor de 80 a 90%, fueron aisladas por un clasificador celular magnéticamente activado (MACS), usando CD44 microBeads humanas (Miltenyi, Biotecs) como lo describe la literatura del proveedor. Las poblaciones celulares aisladas fueron identificadas como células troncales mesenquémicas basado en su habilidad para adherirse a los pozos celulares plásticos, su morfología fusiforme y la expresión de marcadores anti CD44 humano. Las CTPDH del tercer pasaje fueron sembradas a una densidad de  $5 \times 10^3$  por pozo, para ser utilizadas en los ensayos de viabilidad y proliferación celular.

### Aislamiento y Cultivo de Osteoblastos de Ratón

Las células osteoblásticas de ratón (COR) se aislaron de los fémur de 5 ratones hembras de 4 días de edad, los cuales fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub>. El manejo y uso de los animales se realizó apegado a la NOM-062-ZOO-1999, “Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio”. Las muestras fueron preservadas en una solución fisiológica (PiSA) suplementada con antibióticos y antimicóticos (Sigma-Aldrich) durante una noche a 4 °C; los huesos se lavaron con PBS

(Biowest) con el fin de eliminar medula ósea y otros desechos biológicos como cartílago y músculo. El tejido se cortó en trozos pequeños de 2 mm<sup>2</sup> aproximadamente para la digestión enzimática en colagenasa tipo I (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos, cultivando en una caja tipo “t” Falcon de 25 cm<sup>2</sup> (Nunclon™) a 37 °C por 15 min, permitiendo la adhesión celular. Se agregó medio de DMEM, incubando a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad en una incubadora; el medio de cultivo fue cambiado 2 veces por semana hasta que las células alcanzaron una confluencia del 80-90%, aproximadamente al quinto día. Después de alcanzar confluencia celular, las células fueron cosechadas y sembradas a una densidad de 5 x 10<sup>3</sup> células por pozo. Para los ensayos celulares con osteoblastos, se utilizaron células del segundo pasaje celular.

#### Ensayos de Viabilidad Celular

La viabilidad celular con CTPDH y con COR fue corroborada por el ensayo de vivas/muertas (Live/Dead, Invitrogen™) de acuerdo con los protocolos del fabricante a los tiempos de 24 h y 10 días. En este caso, calceína AM (0.5 µl) y bromuro de etidio (2.0 µl) fue disuelto en 997.5 µl de PBS (Biowest), añadiendo 100 µl de esta solución a las muestras, e incubando por 30 min mientras era protegido de la luz, a 37 °C en una atmósfera humidificada y con 5% de CO<sub>2</sub>. Las muestras fueron observadas utilizando un microscopio de fluorescencia Ziess HXP 120C observado la superficie con las células, y posteriormente las células fueron contadas.

#### Ensayos de Proliferación Celular

La proliferación de CTPDH fue evaluada por ensayos de MTT, el cual es una prueba colorimétrica utilizada para evaluar la actividad metabólica de proliferación basada en la función óxido-reductiva realizada por la enzima deshidrogenasa mitocondrial. La prueba MTT (Roche® Life Science) fue utilizada para determinar la proliferación celular en los materiales compuestos sembrados con 5 x 10<sup>3</sup> de CTPDH, después de 24 horas y 10 días de cultivo. Posterior al periodo de incubación, 100 µl de dimetil sulfóxido (DMSO) fue añadido para solubilizar las sales de formazán. Posteriormente, la mezcla fue analizada en un lector de microplatos Elisa BMG Labtech POLARstar OPTIMA, BMG Labtech, a 570 nm.

La proliferación de COR fue evaluada mediante ensayos con Alamar Blue (AB), ya que a diferencia de la prueba por MTT no produce la muerte celular. Fue utilizada una dilución 5980  $\mu$ l DMEM sin rojo fenol y 20  $\mu$ l de sal de rezasurina sódica (Sigma-Aldrich). Las células se sembraron por quintuplicado a una densidad de  $1 \times 10^3$  por pozo en placas de 96 pozos, después de 24 h, y 10 días de incubación a 37 °C con el 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, se añadió 100  $\mu$ l de la dilución de AB, protegiéndola de la luz, e incubando durante dos horas. La fluorescencia se midió usando un lector de microplatos Elisa BMG Labtech POLARstar OPTIMA, BMG Labtech, a 550 nm.

## 2.3. Materiales Compuestos a Base de Poliuretano y Titanio en Forma de Espuma

### Materiales

Se utilizaron los reactivos enlistados a continuación:

Aceite de ricino (Sigma, CAS 8001-79-4)

Diisocianato de isoforona (Aldrich, CAS 4098-71-9)

1,4-butanodiol (Aldrich, CAS 110-63-4)

Octanoato de estaño (Aldrich, CAS 301-10-0)

### Métodos

#### 2.3.1. Obtención de Espumas de Poliuretano puro y materiales compuestos de PU y Ti

Para la síntesis del poliuretano se utilizó aceite de ricino (CO), 1,4-butanodiol y diisocianato de isoforona (IPDI). Tanto el aceite de ricino como el 1,4-butanodiol fueron secados a presión reducida a 120°C. Los materiales compuestos fueron preparados y espumados simultáneamente. Se elaboraron materiales compuestos a porcentajes de Ti de 1, 3 y 5% p/p.

La síntesis de PU se llevó a cabo en un vaso de precipitado de 100 ml con las composiciones que se mencionan en la tabla 2.3.1. En el interior del vaso de precipitado se colocaron 11.675 g de aceite de ricino, 101 mg de octanoato de estaño, como catalizador (0.5%), la cantidad correspondiente de partículas de Ti, y se agitaron uniformemente mediante agitación magnética en una placa de calentamiento a 60 °C. Después, fueron añadidos 6.94 g de IPDI gota a gota a la mezcla de aceite de ricino / Ti. La reacción se mantuvo en agitación magnética a 60 °C, tapada con parafilm por un período de 10 a 15 min para convertirse en un prepolímero. La figura 2.2 muestra la estructura química propuesta para la reacción del prepolímero. Luego se utilizó 1.125 g de 1,4-butanodiol como extensor de cadena para entrecruzar el prepolímero, le fueron agregados 0.3 g de agua desionizada, y se agitó durante 2 min para homogenizar, hasta que comenzara a espumar. Finalmente, la última mezcla fue colocada en una estufa de vacío a 120 °C durante 2 h para la formación de espuma, y el tiempo de levantamiento de la espuma fue registrado. Adicionalmente se obtuvo espumas de PU puro siguiendo la misma metodología, excluyendo los pasos que involucran al Ti.

Tabla 2.2. Reactivos para la preparación de las espumas de PU y PU/Ti.

Reactivo	PU	PU/1%Ti	PU/3% Ti	PU/5% Ti
CO	11.675 g	11.675 g	11.675 g	11.675 g
IPDI	6.94 g	6.94 g	6.94 g	6.94 g
Butanodiol	1.125 g	1.125 g	1.125 g	1.125 g
Agua desionizada	0.3 g	0.3 g	0.3 g	0.3 g
Octanoato de estaño	101 mg	101 mg	101 mg	101 mg
Ti	-	205 mg	626 mg	1.06 g

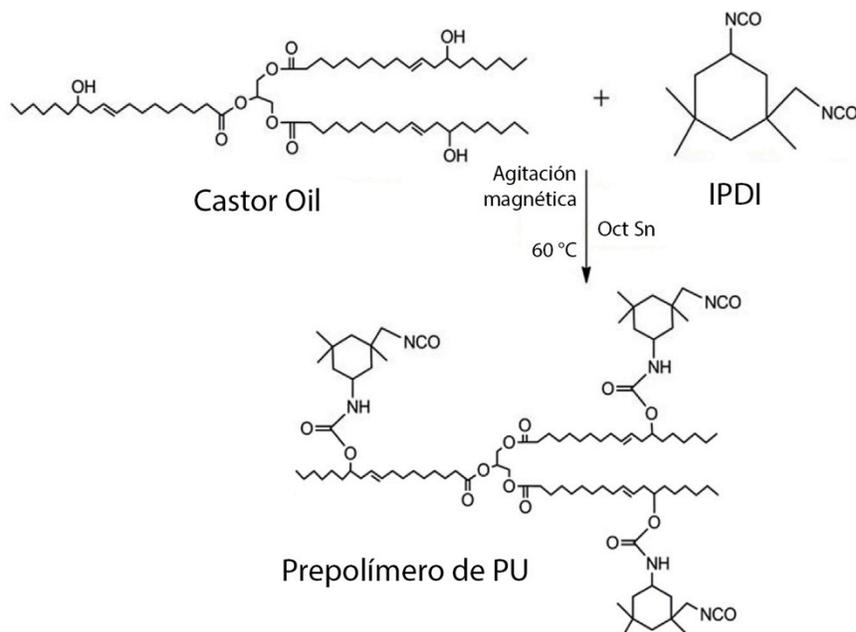


Figura 2.2. Síntesis del prepolímero del poliuretano a base de aceite de ricino, CO.

### 2.3.2. Caracterización Físicoquímica de las Espumas de PU/Ti

Las espumas fueron caracterizadas mediante FTIR, Raman, MEB y DRX, siguiendo la metodología descrita en la sección 2.1.2.1 mientras que EDX, TGA siguiendo la metodología descrita en la sección 2.2.2.2.

### DMA

Los ensayos de DMA se realizaron con un equipo Perkin-Elmer modelo DMA-7 en modo de compresión utilizando platos paralelos para las espumas de los materiales de PU y titanio; las muestras se analizaron en un intervalo de temperatura de -80° a 140 °C a una frecuencia de 1 Hz, una rampa de calentamiento de 5 °C/min y un promedio de carga

estática de 90 y dinámica de 70 mN. Las muestras para dichas pruebas fueron cubos de 5 mm por lado.

### DSC

Se realizó un análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un equipo DSC Discovery de TA Instruments, utilizando de 5 a 7 mg de muestra de cada espuma de los materiales y se calentaron entre -40° y 80 °C con una tasa de calentamiento de 5 °C/min y atmósfera de nitrógeno.

### Propiedades de Espumado

El cálculo de la porosidad se realizó previa determinación de la densidad relativa, y aplicando la ecuación 5.

$$\text{Porosidad} = 1 - \text{densidad relativa} \quad \text{Ec. 5.}$$

La densidad relativa ( $\rho_{\text{rel}}$ ), a su vez, se estableció utilizando la densidad de la espuma ( $\rho_{\text{esp}}$ ) y la densidad del sólido que la conforma ( $\rho_{\text{sol}}$ ), aplicando la ecuación 6. La  $\rho_{\text{esp}}$  de las espumas se calculó, mediante la medición de la masa de 1 cm<sup>3</sup> de espuma como se muestra en la figura 2.3.

$$\rho_{\text{rel}} = \rho_{\text{esp}} / \rho_{\text{sol}} \quad \text{Ec. 6.}$$

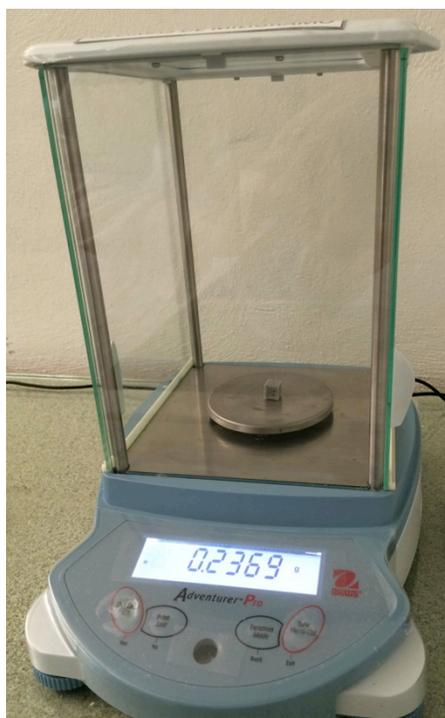


Figura 2.3. Cubo de espuma de material compuesto siendo pesado para la determinación de la densidad.

La determinación de la densidad del PU sólido ( $\rho_{\text{sol}}$ ) se realizó por el principio de Arquímedes, colocando en una balanza analítica un sólido del polímero sin espumar cuyo peso fue registrado (peso en el aire); posteriormente el mismo sólido fue colocado en la balanza analítica inmerso en un líquido auxiliar de densidad conocida (ver figura 2.4). La densidad se calculó utilizando la fórmula (ver ecuación 7):

$$\rho_{\text{sol}} = [A / (A - B)] \times \rho_a \quad \text{Ec. 7.}$$

En donde:  $\rho_{\text{sol}}$  es la densidad del sólido a establecer, A es el peso del sólido en el aire, B es el peso del sólido en el líquido auxiliar, y  $\rho_a$  es la densidad del líquido auxiliar a una temperatura determinada. El líquido auxiliar utilizado fue agua a 25 °C ( $\rho_a = 0.997 \text{ g/cm}^3$ ).

Adicionalmente, el cálculo teórico de la densidad del polímero, así como la densidad de los materiales compuestos fue calculada por la regla de las mezclas.

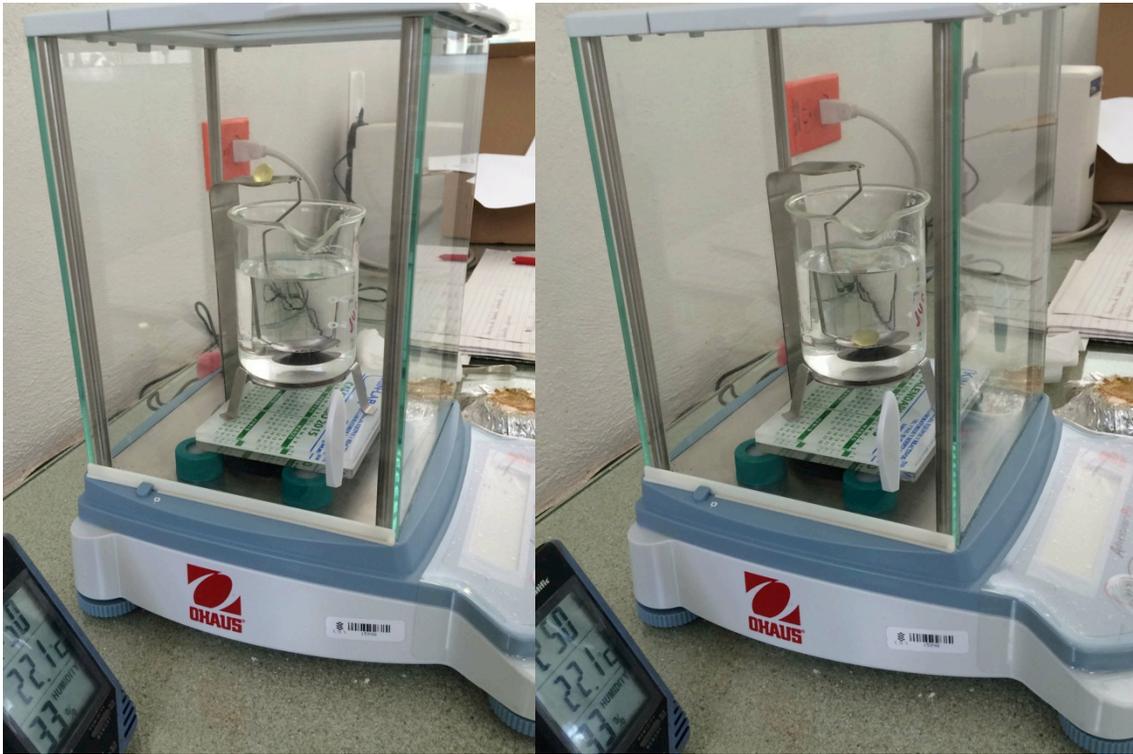


Figura 2.4. Determinación de la densidad del polímero sin espumar, por el principio de Arquímedes.

### 2.3.3. Caracterización Mecánica de las Espumas de PU/Ti

Las pruebas mecánicas de compresión se realizaron a las espumas de PU puro y de los materiales compuestos de PU/Ti con el fin de determinar su módulo de elasticidad ( $E$ ) y esfuerzo a compresión ( $\sigma$ ). Dichas pruebas se realizaron según la norma ASTM D1621, usando una máquina de pruebas universales MINI SHIMADZU con una celda de carga de 1 kN, a una velocidad de desplazamiento del cabezal de 2.5 mm/min. La prueba de compresión consiste en colocar la probeta entre dos placas planas; una fija y otra móvil sujeta al cabezal de la máquina de pruebas universales. Se utilizaron probetas cortadas en forma de cubo, con un tamaño de 10 mm por lado, la carga fue aplicada hasta que la muestra se comprimió aproximadamente un 30% de su longitud original. Fueron probadas al menos cinco muestras para cada material ensayado. Los valores que se reportan son el esfuerzo, el cual se calculó a una deformación del 10%, y el módulo elástico.

#### *2.3.4. Pruebas de Degradación in vitro de las Espumas de PU/Ti*

Las pruebas de degradación *in vitro* se realizaron por reflujo a 100 °C durante 24 horas en soluciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, HCl 2M, NaOH 5M, NaClO al 6%, utilizando agua destilada como control, con muestras de 200 mg aproximadamente, siguiendo la metodología descrita en la sección 2.2.2.4.

#### *2.3.5. Ensayos de Biocompatibilidad de las Espumas de PU/Ti*

Las pruebas de viabilidad y proliferación para las espumas de los materiales estudiados fueron realizadas con CTPDH, aisladas y cultivadas según la metodología descrita en la sección 2.2.2.5. Previamente a los ensayos, las espumas de los materiales compuestos de PU, PU/1% Ti, PU/3% Ti, PU/5% Ti fueron esterilizados por luz ultravioleta por 20 min para cada uno de sus seis lados. Las pruebas celulares se realizaron por quintuplicado, y pozos sembrados con células fueron utilizados como controles. Los resultados de las pruebas celulares se reportan como porcentaje de la absorbancia respecto a los controles celulares para cada tiempo de incubación. Pruebas de análisis de la varianza (ANOVA) fueron realizados para las pruebas celulares, siguiendo la metodología descrita en la sección 2.4.

##### Ensayos de Viabilidad Celular

La viabilidad celular fue corroborada por el ensayo AB a los tiempos de 7, 14 y 21 días, siguiendo la metodología descrita en la sección 2.2.2.5.

##### Ensayos de Proliferación Celular

La proliferación celular de las espumas de los materiales fue evaluada por ensayos de MTT, a los tiempos de incubación de 7, 14 y 21 días. Los ensayos de MTT se realizaron siguiendo la metodología descrita en la sección 2.2.2.5.

## 2.4. Análisis de Resultados

Los resultados obtenidos de las diferentes pruebas fueron registrados, capturados y analizados con Microsoft Excel (Microsoft Corporation) y Origin (Origin Lab), para ser tabulados, graficados y realizar su análisis estadístico. Los resultados se reportan indicando los valores de media y desviación estándar; la mayoría de las pruebas descritas en la metodología se realizó por triplicado, a menos que en la descripción se indique otra cantidad. Adicionalmente, a las pruebas que así lo indican se les realizó un análisis de la varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) de una vía, con una prueba de Tukey para comparación entre grupos, utilizando el software Minitab (Minitab Inc.). Para las pruebas estadísticas, fue utilizado un mínimo de  $n = 3$ , y un nivel de significancia del 5% ( $\alpha = 0.05$ ), por lo que valores de  $p < 0.05$  fueron considerados significativos.

## CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Partículas de Titanio

#### 3.1.1. Caracterización de las Partículas de Titanio

##### 3.1.1.1. Tamaño de Partícula

LD

El tamaño de partícula determinado por LD en agua destilada, mostró un promedio de tamaño de partícula de  $23.5 \mu\text{m}$  (ver figura 3.1), una mediana de  $23.2 \mu\text{m}$ , moda de  $28.7 \mu\text{m}$ , en un intervalo de dispersión de  $1.5 \mu\text{m}$  a  $43.6 \mu\text{m}$ , lo que coincide con las especificaciones del fabricante, quien reporta en la hoja técnica del producto una media de tamaño de partícula de  $18 \mu\text{m}$ , desviación estándar de  $\pm 3 \mu\text{m}$ , y un máximo de tamaño de partícula de  $45 \mu\text{m}$ .

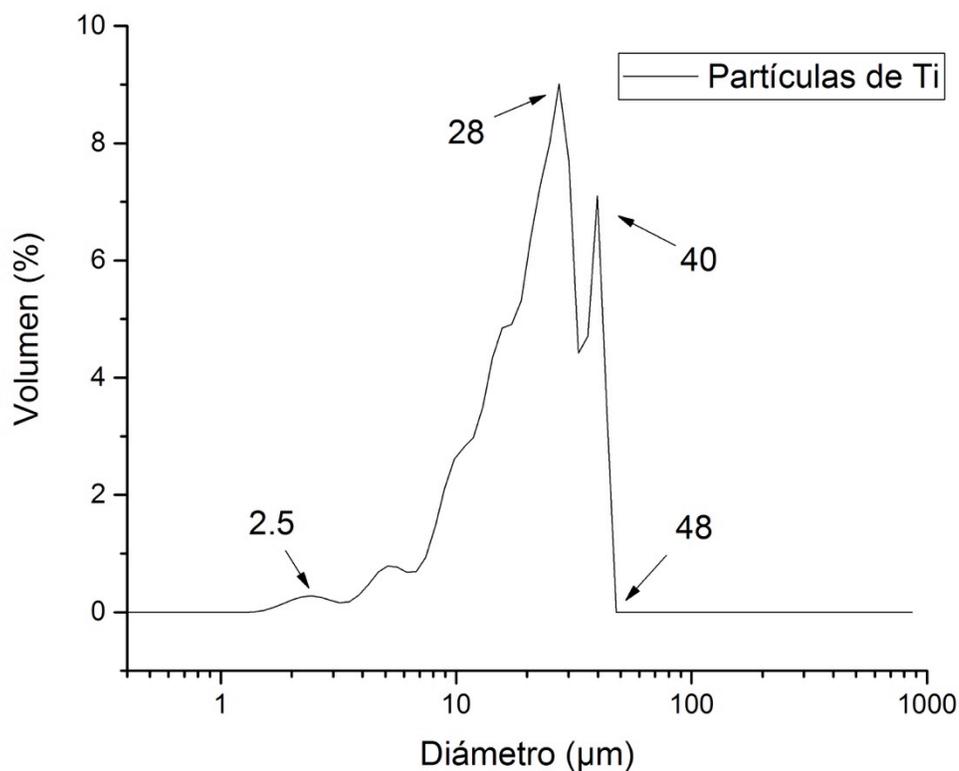


Figura 3.1. Distribución de tamaños de partícula de titanio determinado por DL.

## DLS

El tamaño de partícula de titanio fue verificado en la escala nanométrica por DLS, para una mejor comprensión de sus propiedades, los resultados se presentan en la figura 3.2. Se determinó que el intervalo del tamaño de partícula de titanio se extiende a la escala nanométrica, presentando porcentaje relevante  $\approx 250$  nm.

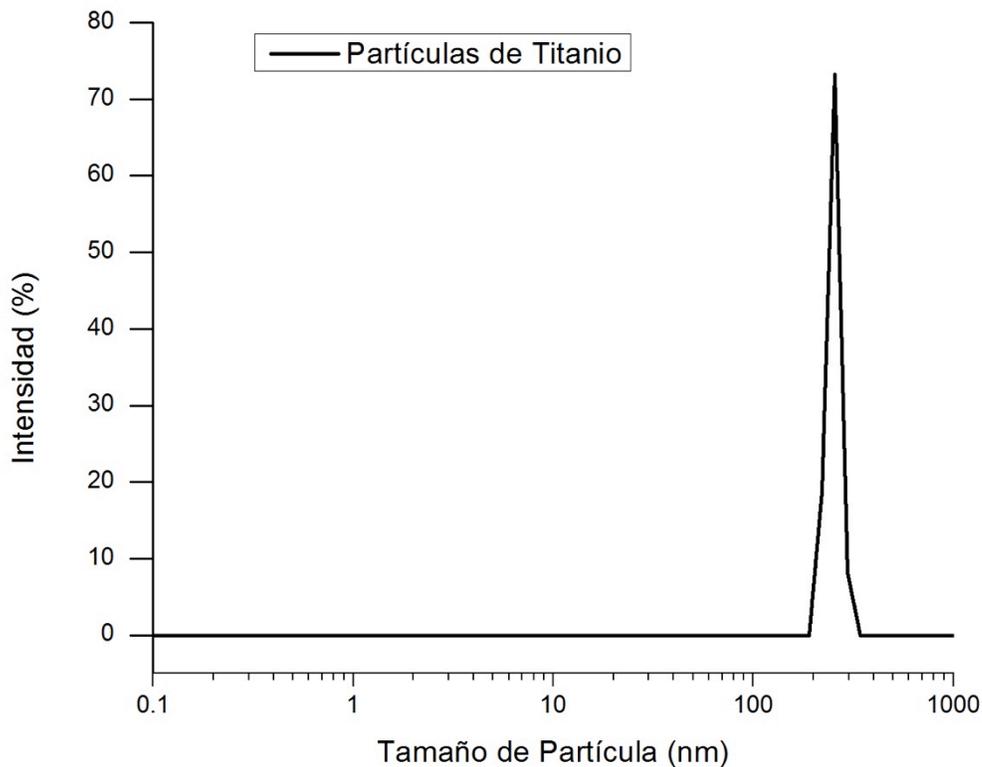


Figura 3.2. Distribución de tamaños de partícula de tianio determinado por DSL.

### 3.1.1.2. FTIR

Las partículas de titanio fueron analizadas para determinar su composición; al tratarse de partículas de un elemento metálico éstas no deberían ser registradas por FTIR, sin embargo si las partículas fueran de óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) se podrían verificar bandas asociadas al enlace Ti-O. El análisis por FTIR (ver figura 3.3) de las partículas no evidencia las bandas características del óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) en  $510$  y  $550 \text{ cm}^{-1}$  [89]. Únicamente se observan

bandas de absorción de agua a  $3432\text{ cm}^{-1}$ , especies con contenido de carbono a  $2921$  y  $2852\text{ cm}^{-1}$ , y enlaces Ti-O a  $705\text{ cm}^{-1}$  [90].

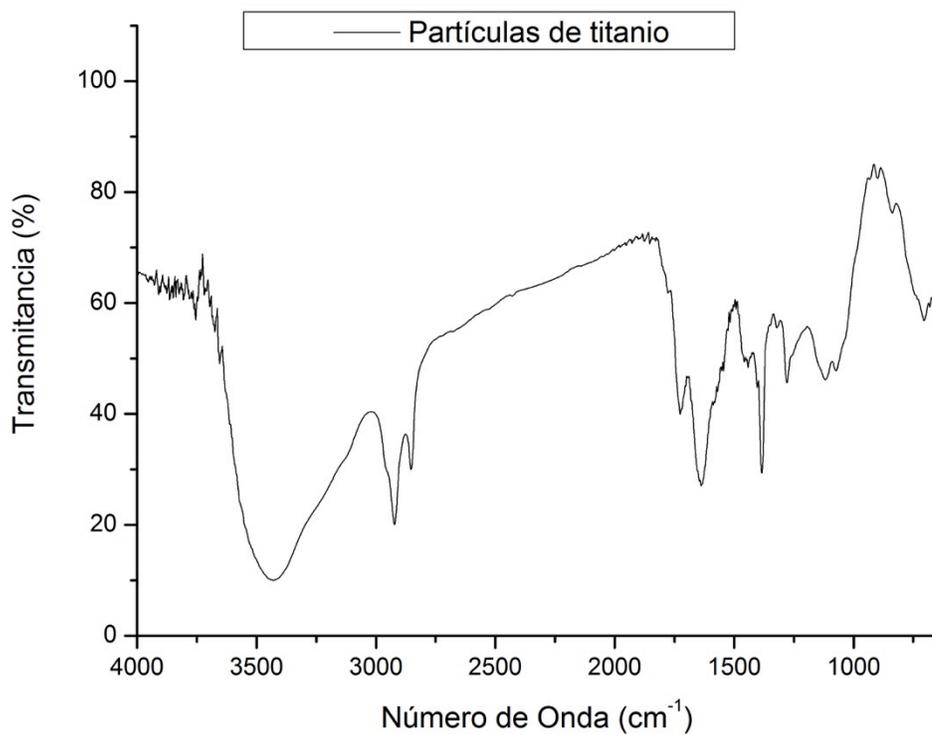


Figura 3.3. Espectro de FTIR de las partículas de titanio.

### 3.1.1.3. Raman

El análisis por espectroscopía Raman fue realizado a las partículas de titanio como complemento del análisis de FTIR. El espectro Raman de las partículas de titanio, muestra los picos a  $417$  y  $610\text{ cm}^{-1}$  que son asignados a enlaces Ti-O, como se muestra en la figura 3.4, concordando con el análisis superficial esperado para las partículas de titanio [74].

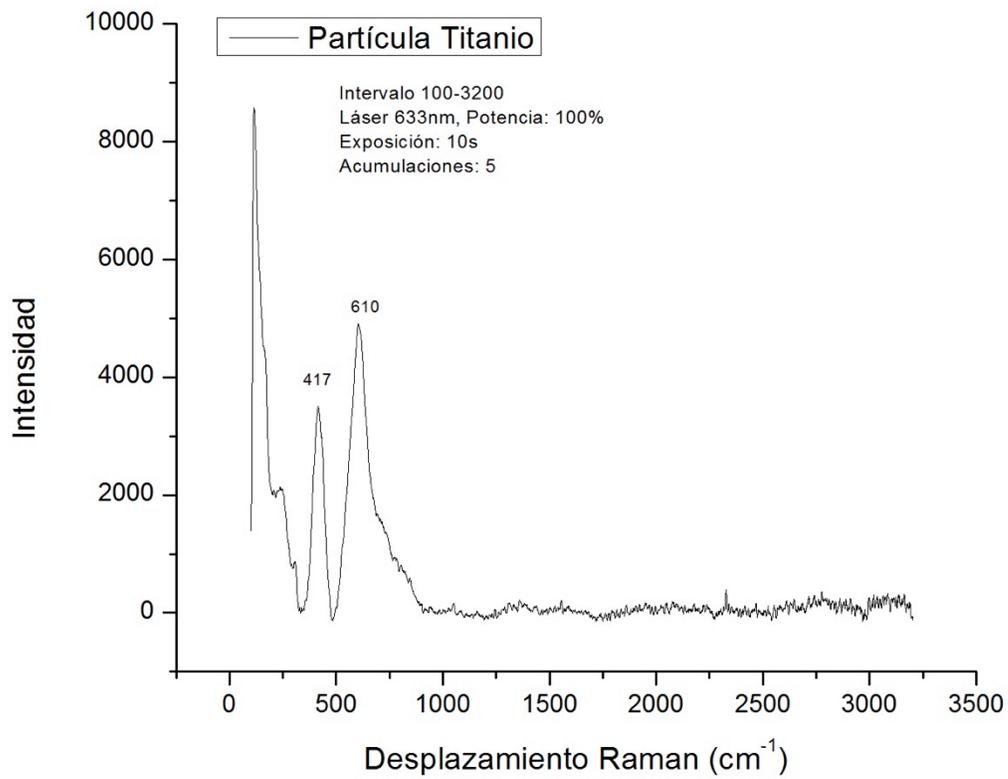


Figura 3.4. Espectro Raman de las partículas de titanio.

#### 3.1.1.4. MEB

Las micrografías de las partículas de titanio obtenidas por MEB se presentan en la figura 3.5. Las partículas se observan de forma y textura irregulares.

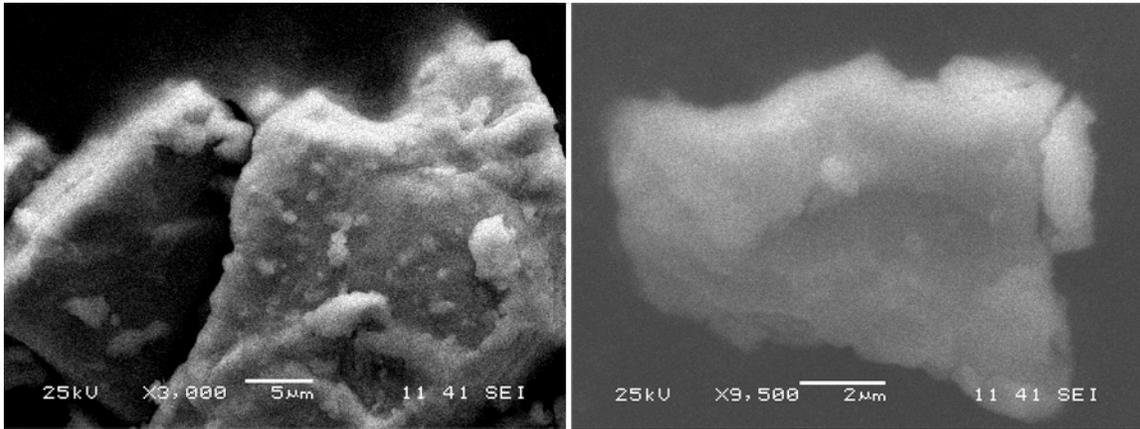


Figura 3.5. Imágenes MEB de partículas de titanio.

#### 3.1.1.5. EDX

El microanálisis elemental por EDX muestra una composición de porcentaje de peso de  $98.8 \pm 0.3\%$  de titanio y  $1.2 \pm 0.3\%$  de carbono, sin mostrar contenido de oxígeno, como se podría esperar en caso de que las partículas fueran de óxido de titanio. En la figura 3.6 se muestra el espectro de identificación de picos proporcionada por el equipo de EDX.

La importancia de distinguir las partículas de titanio de partículas de óxido de titanio, es debido a que las partículas de óxido de titanio son las más frecuentemente utilizadas como rellenos en materiales compuestos para aplicaciones médicas [61], no así las partículas de titanio, utilizadas en esta investigación [52,91].

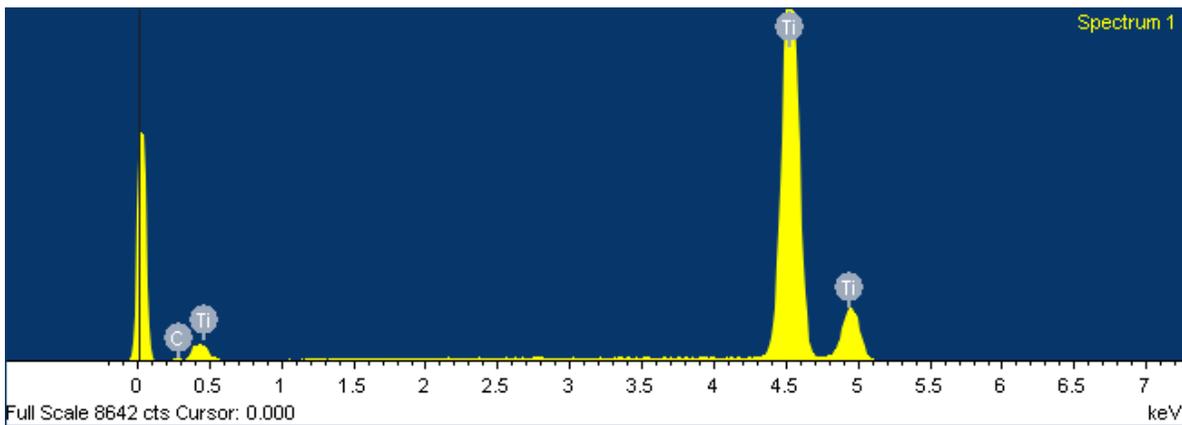


Figura 3.6. Análisis elemental por EDX de las partículas de titanio.

### 3.1.1.6. DRX

El análisis DRX confirmó que las partículas estudiadas fueron de titanio (figura 3.7) de estructura cristalina hexagonal, mostrando picos característicos para el titanio comercialmente puro, el principal a  $40.2^\circ$  y otros asociados a  $35.1^\circ$  y  $38.4^\circ$  [74], el halo amorfo alrededor de  $12.5^\circ$  se debe probablemente a la capa oxidada que cubre superficialmente al titanio puro.

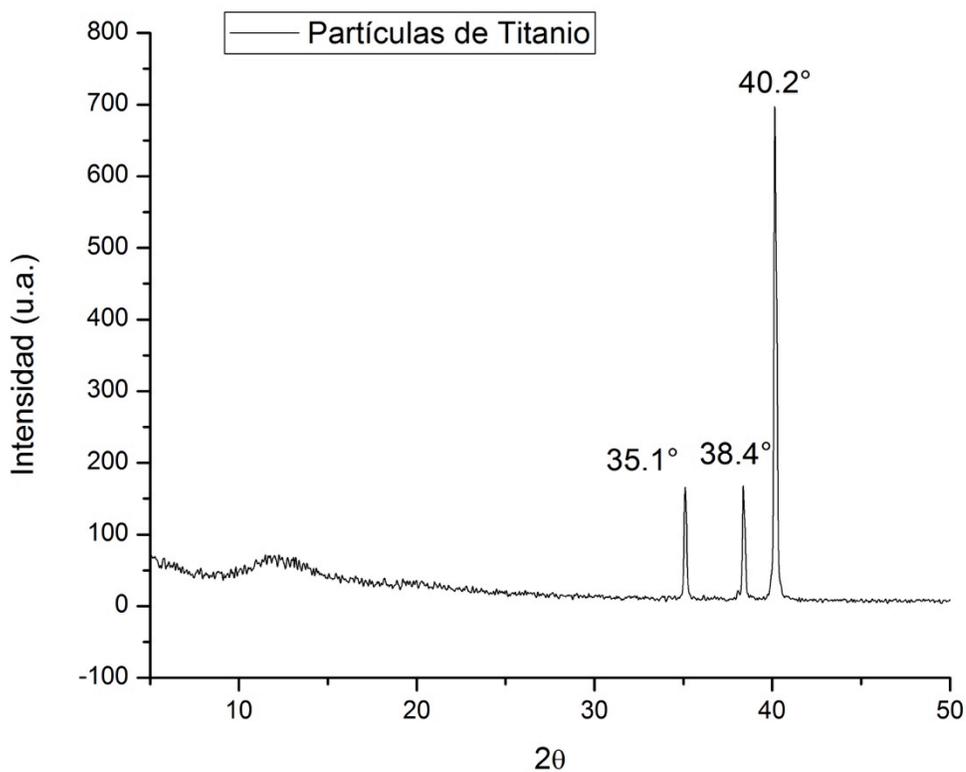


Figura 3.7. DRX de partículas de titanio.

### 3.1.1.7. XPS

En el análisis por XPS de las partículas de titanio, que se muestra en la figura 3.8, se observaron picos alrededor de 530.2 eV, 458.6 eV y 284.7 eV, que se asocian a O1s, Ti2p y C1s respectivamente [59,92]. La composición elemental porcentual por XPS de las partículas de titanio comercialmente puro que se presenta en la tabla 3.1, es concordante

con la reportada por Liu et al. [74]. Se realizó la deconvolución de los picos O1s y Ti2p (ver figuras 3.9 y 3.10) para inferir de manera más específica la composición de las partículas. Por otra parte, la presencia de carbono (pico C1s) puede deberse a residuos de la síntesis de las partículas.

Tabla 3.1. Análisis elemental por XPS de las partículas de Ti tratadas y no tratadas.

Elemento	Titanio no tratado	Titanio tratado
Oxígeno	54.4	55.3
Titanio	23.1	24.5
Carbono	22.5	20.1

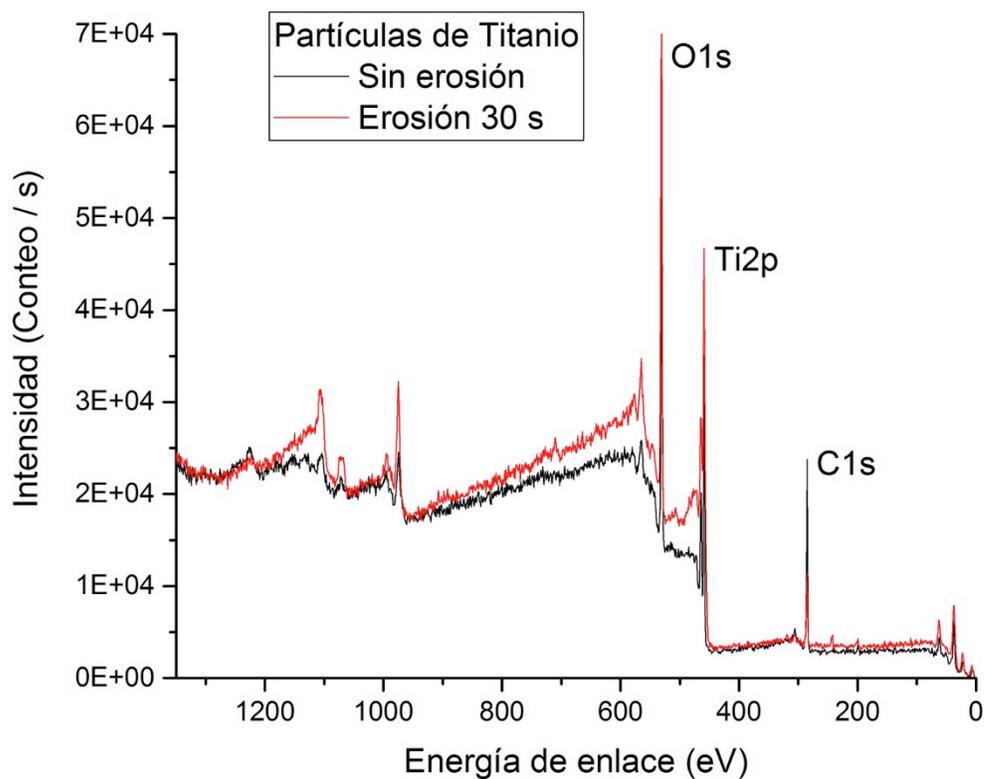


Figura 3.8. Espectro de XPS (inspección) de las partículas de titanio, realizadas en la superficie y posterior a una erosión por 30 s.

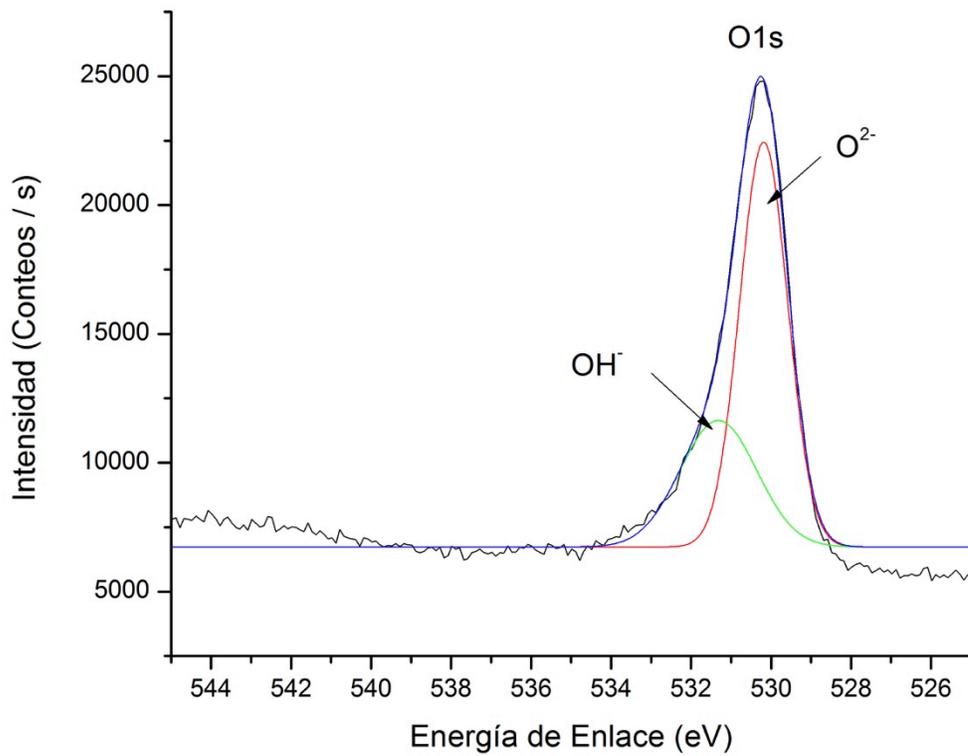


Figura 3.9. Deconvolución del pico O1s del XPS de la superficie erosionada de las partículas de titanio.

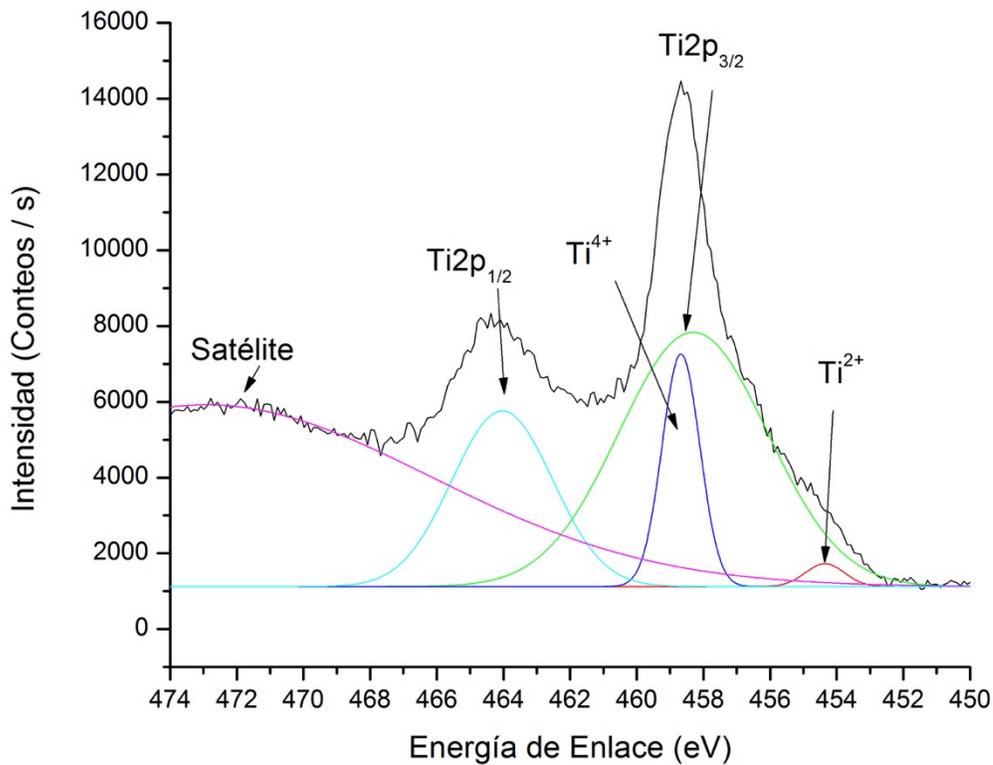


Figura 3.10. Deconvolución del pico Ti2p del XPS de la superficie erosionada de las partículas de titanio.

La deconvolución de los picos de Ti2p sugiere presencia de Ti<sup>4+</sup> en mayor concentración, y Ti<sup>2+</sup>, el cual se asocia al titanio metálico; la superficie no erosionada no presenta pico de Ti<sup>2+</sup>. La deconvolución del pico de O1s muestra la presencia de O<sup>2-</sup> y OH. Se considera entonces que las partículas son de titanio metálico con una capa superficial oxidada espontáneamente al contacto con el aire; el espesor de la capa oxidada ha sido reportado entre los 3 y 7 nm, y va aumentando con el tiempo, pudiendo ser de hasta ≈25 nm [74]. La deconvolución del pico de C1s muestra una banda única asociada a carbono.

### 3.1.2. Tratamiento Superficial de las Partículas de Titanio

#### 3.1.2.1. XPS

En el análisis por XPS de las partículas de titanio tratadas, que se muestra en la figura 3.11, se observaron picos alrededor de 530.3 eV, 458.7 eV y 284.7 eV, que se asocian a O1s, Ti2p y C1s respectivamente [59]. La composición elemental por XPS de las partículas tratadas, no muestra alguna diferencia con la composición de las partículas sin tratar, como se observa en la tabla 3.1. Por otra parte, la presencia de carbono (pico C1s) proveniente de residuos de la síntesis de las partículas disminuyó en las partículas activadas, lo cual es concordante con lo esperado, ya que, la activación debería reducir la cantidad de contaminantes y posibles restos de la síntesis, en comparación con las partículas no activadas. La deconvolución de los picos O1s y Ti2p (ver figuras 3.12 y 3.13) de las partículas de titanio activadas, mostró en los picos correspondientes a Ti2p<sub>3/2</sub> la presencia de Ti<sup>4+</sup>, siendo el principal; las partículas tratadas, a diferencia de las no tratadas, no presentan el pico de Ti<sup>2+</sup>. La deconvolución del pico de O1s muestra la presencia de O<sup>2-</sup> y OH, en las partículas tratadas, se observa un aumento en la proporción del pico correspondiente a OH, lo que sería esperado posterior a la activación de las partículas de Ti [72]. Adicionalmente, se encontró una banda asociada a la probable presencia de H<sub>2</sub>O. La deconvolución del pico de C1s muestra una banda única asociada a carbono.

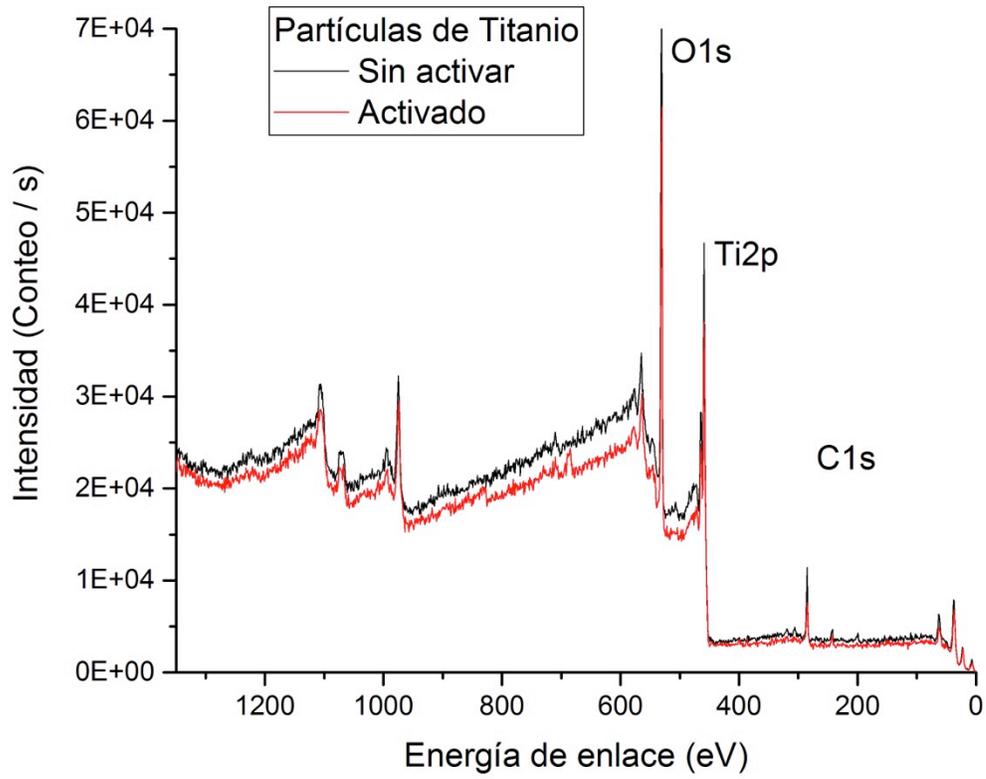


Figura 3.11. Espectros XPS de las partículas de titanio activadas y no activadas.

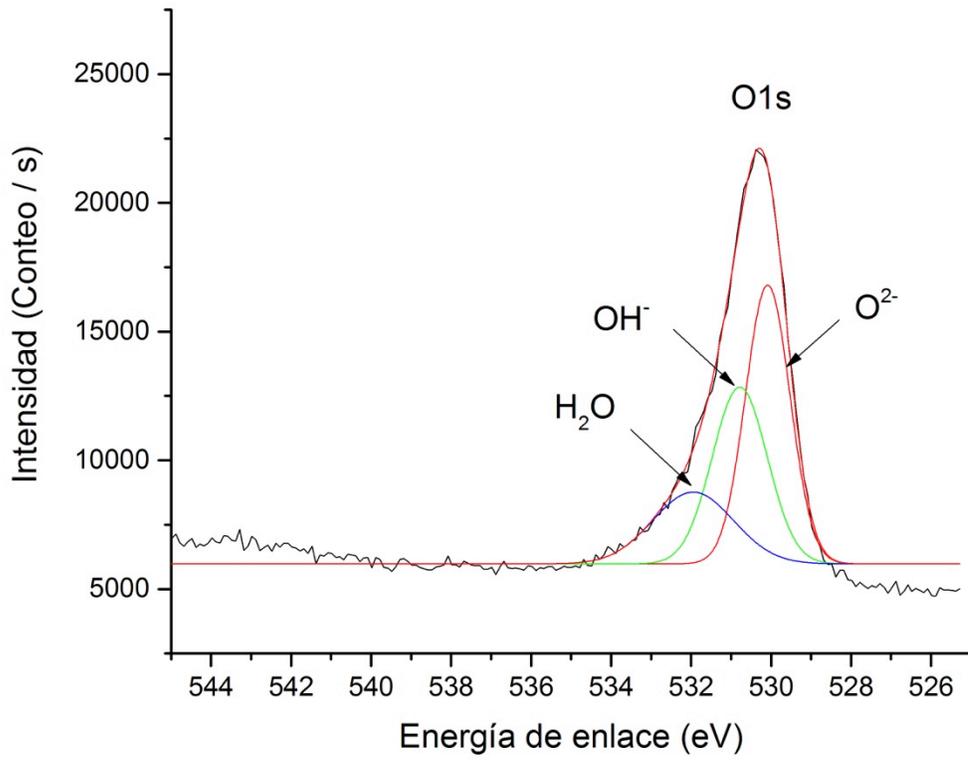


Figura 3.12. Deconvolución del pico O1s del XPS de la superficie de las partículas de titanio activadas.

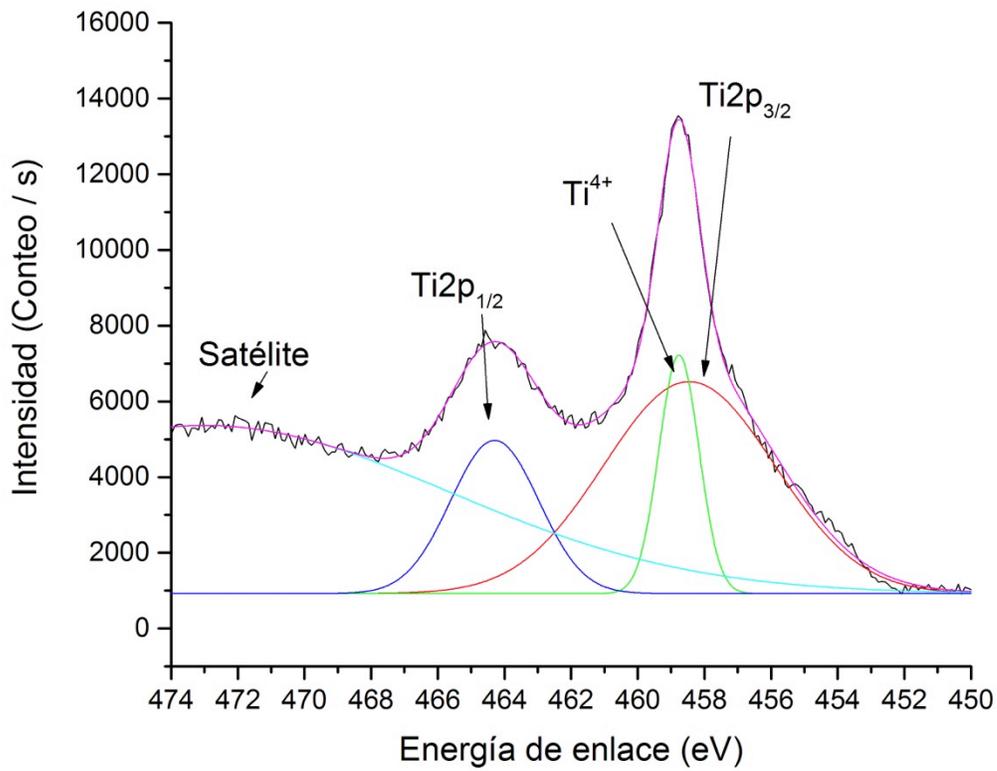


Figura 3.13. Deconvolución del pico Ti2p del XPS de la superficie de las partículas de titanio activadas.

## 3.2. Materiales Compuestos de Poliuretano y Titanio en Forma de Película

### 3.2.1. Caracterización Físicoquímica de las Películas de SPU-G/Ti

Las películas de SPU-G y materiales compuestos de SPU-G y Ti, mostraron ser más opacos y menos translúcidos, a medida que la cantidad de titanio aumenta en la mezcla. Así mismo, las películas del SPU-G puro cambiaron de un blanquecino translúcido a un gris más oscuro a mayor cantidad de titanio.

#### 3.2.1.1. FTIR

El espectro de infrarrojo de las películas de SPU-G y materiales compuestos de SPU-G y Ti se presenta en la figura 3.14. El material sin contenido de titanio presenta absorciones a  $3373\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al enlace N-H del grupo uretano/urea, y a  $2932$  y  $2860\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a las vibraciones asimétricas y simétricas respectivamente, del grupo  $\text{CH}_2$  de la PCL, HMDI y glutamina. El estiramiento del grupo carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ) se observa en el intervalo de  $1680$  y  $1760\text{ cm}^{-1}$ , el cual incluye el grupo éster proveniente de la PCL, y al grupo uretano ( $\text{NHCOO}$ ). La absorción del enlace Amida II (doblamiento del uretano N-H + estiramiento del C-N) se localiza a  $1530$  y  $1240\text{ cm}^{-1}$ , mientras que el pico a  $1165\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a la vibración de estiramiento del enlace C-O-C del segmento flexible [9,48]. Bandas de absorción a  $1636\text{ cm}^{-1}$  asociadas al grupo urea son detectadas, en concordancia con reportes previos [1,11,51].

En los materiales compuestos, las absorciones del SPU-G se mantienen y no se observan bandas asociadas al contenido de titanio, probablemente debido a que los enlaces metal-metal no producen vibraciones detectables por espectrómetros convencionales de FTIR utilizando ATR, o debido a un enmascaramiento debido a su baja concentración en contenido porcentual en peso [90].

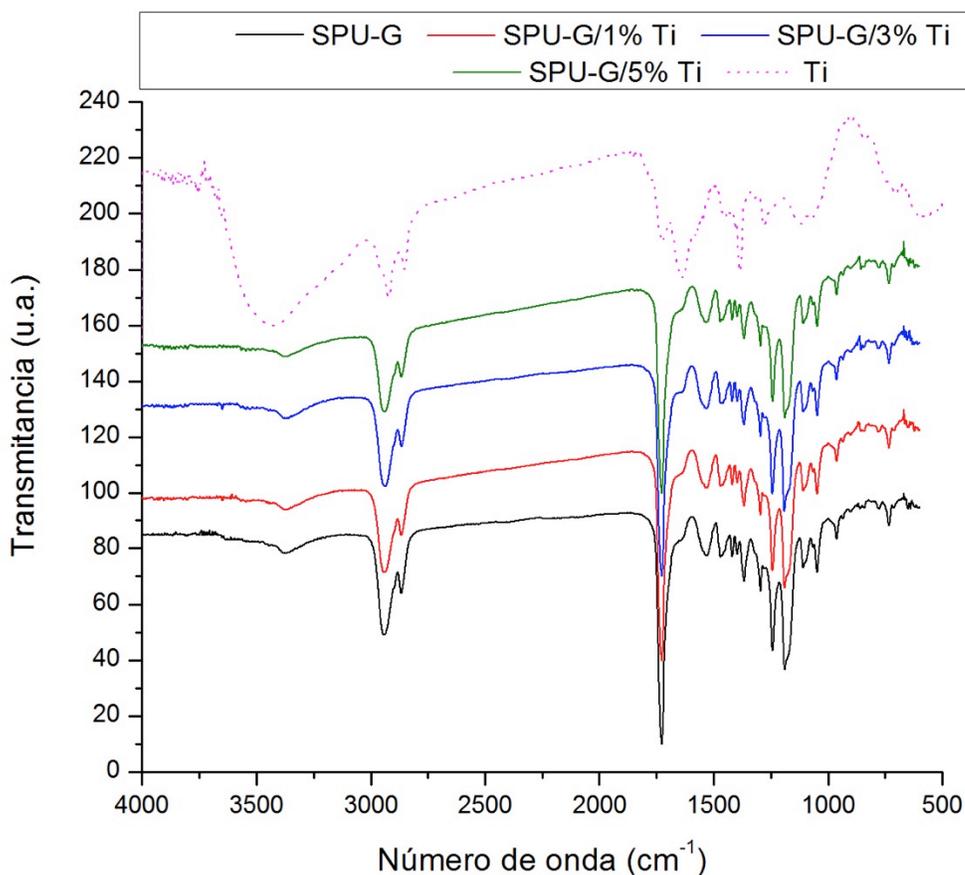


Figura 3.14. Espectro FTIR de las películas de SPU-G y Ti.

### 3.2.1.2. Raman

La espectroscopía Raman pretendió identificar las partículas de titanio presentes en el compuesto (ver figura 3.15). Se esperaba que la fase de rutilo del  $\text{TiO}_2$  mostrara bandas o picos a  $141.1$ ,  $466.3$ ,  $614.5$  y  $819.1 \text{ cm}^{-1}$ , mientras que la fase de anatasa a  $141.1$ ,  $154.4$ ,  $381.8$ ,  $503.7$ ,  $526.9$  y  $653.6 \text{ cm}^{-1}$ . En los materiales compuestos de SPU-G y Ti no presentaron picos a  $417$  y  $610 \text{ cm}^{-1}$ , probablemente debido a la baja concentración de titanio presente en los materiales (ver figura 3.15). Adicionalmente el SPU-G mostró absorciones Raman intensas a  $1108 \text{ cm}^{-1}$  para enlace C-O,  $1305$  y  $1440 \text{ cm}^{-1}$  para  $\text{CH}_2$  o C-N,  $2867 \text{ cm}^{-1}$  para vibración simétrica de  $\text{CH}_2$ , y a  $2919 \text{ cm}^{-1}$  para vibración asimétrica de  $\text{CH}_2$ , y de mediana intensidad a  $1723 \text{ cm}^{-1}$ , asociada al C=O del grupo éster o uretano.

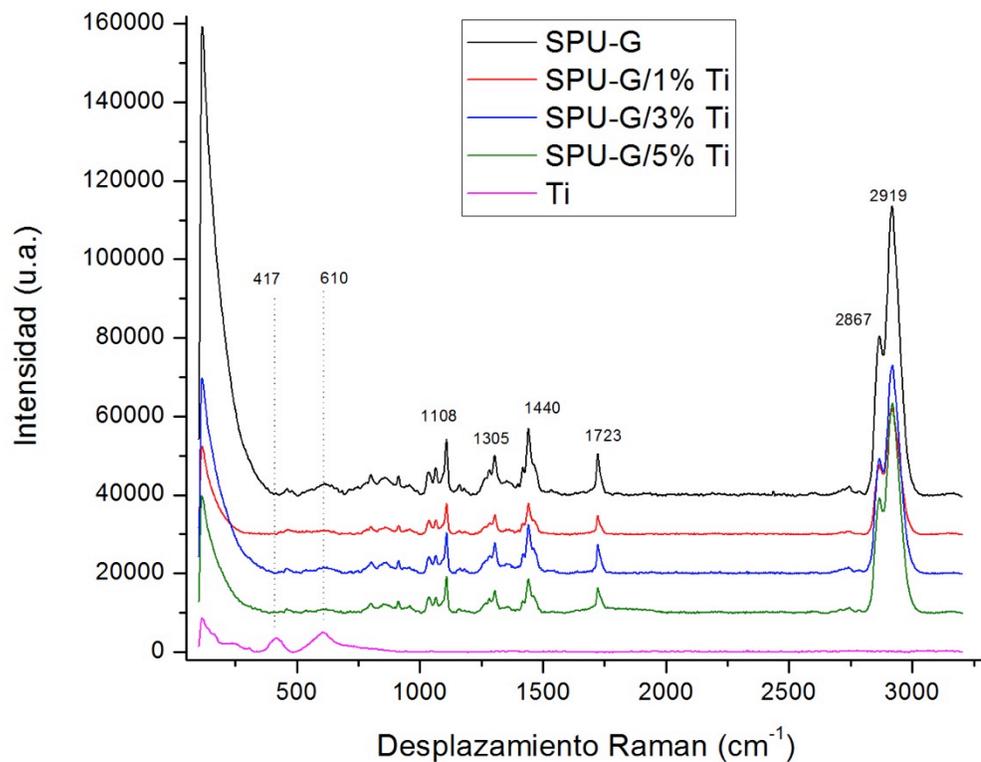


Figura 3.15. Espectroscopía Raman de las películas de SPU-G y Ti.

### 3.2.1.3. MEB

Las imágenes SEM de las películas de materiales compuestos no evidencian la presencia de las partículas de titanio como se observa en la figura 3.16. Las imágenes muestran superficie de las películas consistentes con poliuretanos a base de PCL.

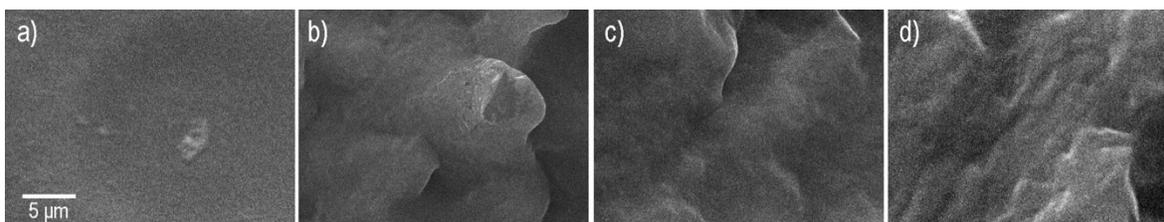


Figura 3.16. Micrografías SEM (x5,000) de las películas de SPU-G (a), y materiales compuestos de 1% Ti (b), 3% Ti (c), y 5% Ti (d).

#### 3.2.1.4. EDX

El mapeo por EDX presentado en la figura 3.17, muestra que las partículas de Ti están dispersas en la superficie de las películas de los materiales compuestos de SPU-G y Ti, además áreas de aglomeraciones de partículas son observables, especialmente en el material con 5% de titanio.

Adicionalmente a la distribución de las partículas de titanio, el microanálisis elemental que se presenta en la tabla 3.2, muestra que mientras el contenido en peso del titanio aumenta en la composición del material compuesto, este elemento detectado por EDX aumenta igualmente, y en una proporción concordante con su composición original en peso. La composición porcentual máxima de peso elemental detectada por EDX para el material compuesto de SPU-G/1% Ti fue de 0.8% para Ti mientras que para SPU-G/3% Ti y SPU-G/5% Ti fue 3.1% y 4.4% respectivamente. Este aumento en relación con el contenido original del Ti, sugiere que las partículas de titanio en general se encuentran homogéneamente distribuidas en las películas de los materiales compuestos, sin embargo en algunas zonas tienden a formar aglomeraciones, cuando la cantidad de partículas de titanio aumenta.

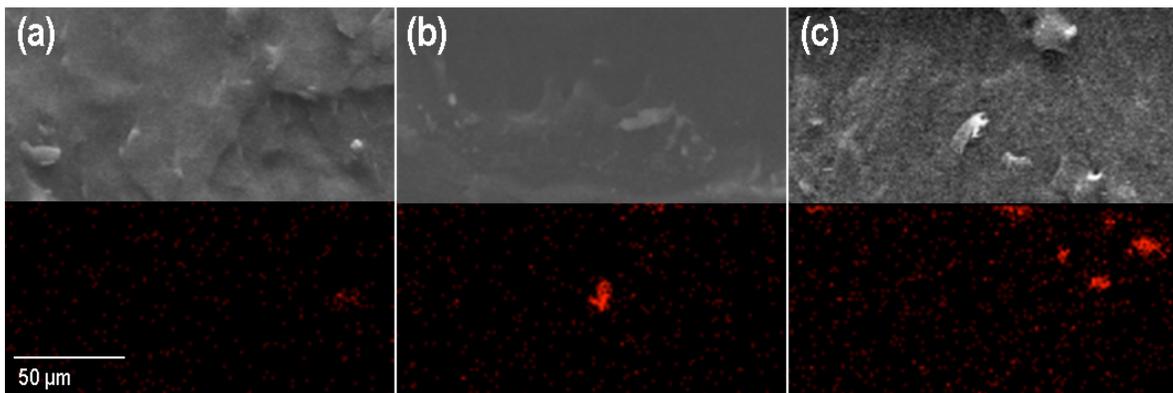


Figura 3.17. Mapeo para titanio por EDX de las películas de los materiales compuestos a) SPU-G/1% Ti, b) SPU-G/3% Ti, y c) SPU-G/5% Ti.

Tabla 3.2. Composición elemental de las películas de SPU-G y Ti por EDX.

	<b>PU</b>	<b>PU/1% Ti</b>	<b>PU/3% Ti</b>	<b>PU/5% Ti</b>
<b>C</b>	66.1 ± 1.3	65.3 ± 0.8	67.7 ± 3.1	67.9 ± 2.3
<b>N</b>	7.6 ± 2.9	8.9 ± 0.3	3.9 ± 2.3	3.9 ± 2.9
<b>O</b>	26.3 ± 0.9	25.0 ± 1.4	25.3 ± 1.4	23.8 ± 2.6
<b>Ti</b>	0 ± 0	0.8 ± 0.7	3.1 ± 0.5	4.4 ± 0.3

### 3.2.1.5. XPS

Las películas de los materiales compuestos de SPU-G/Ti presentaron una composición elemental, determinada mediante análisis de XPS (figura 3.18), en concordancia con la presentada por el microanálisis elemental por EDX. Sin embargo, no se identificó el elemento titanio en la superficie, lo cual no es consistente con el análisis por EDX. Una posible explicación para la ausencia del pico de titanio, podría ser que, dado que la concentración porcentual (Atomic %) máxima de titanio en las partículas de titanio es ≈ 23%, por regla de las mezclas se esperaría que la cantidad de titanio detectable en los materiales compuestos, aún para aquellos con la mayor cantidad de titanio fuera menor a 1.1%, muy cercano al límite de detección típico del análisis por XPS ≈ 1% atómico en la superficie. Además de lo anterior, esta el hecho que existe la posibilidad que las partículas de titanio se encuentren totalmente recubiertas por la matriz de poliuretano, por lo que el análisis superficial podría no detectarlo. En la tabla 3.3 se presentan los porcentajes de composición elemental de las películas de los materiales compuestos obtenidos por XPS y por EDX para su comparación.

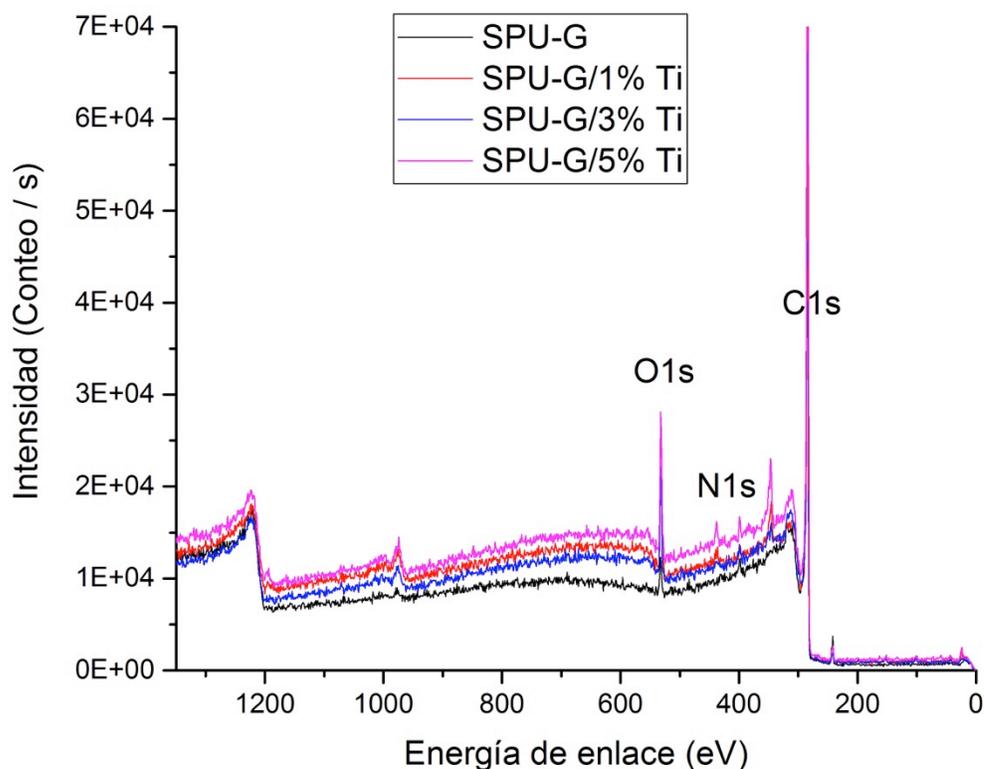


Figura 3.18. Espectros obtenidos mediante XPS de las películas de materiales compuestos de SPU-G/Ti.

Tabla 3.3. Composición elemental (at%) por EDX y XPS de las películas de SPU-G/Ti.

	Carbono		Oxígeno		Nitrógeno		Titanio	
	EDX	XPS	EDX	XPS	EDX	XPS	EDX	XPS
SPU-G	66.1	95.3	26.3	3.2	7.6	1.5	0.0	0.0
SPU-G/1% Ti	65.3	88.8	25.0	8.7	8.9	2.5	0.8	0.0
SPU-G/3% Ti	67.7	90.8	25.3	5.9	3.9	3.3	3.1	0.0
SPU-G/5% Ti	67.9	91.3	23.8	7.3	3.9	1.4	4.4	0.0

#### XPS de Películas de SPU-G/5% Ti Activado

Los resultados de los análisis por XPS de las películas de materiales compuestos de SPU-G/5% Ti, tratado y no tratado, mostraron una composición elemental similar (ver tabla 3.4 y figura 3.19), sin alguna diferencia notable; los elementos detectados fueron: carbono, oxígeno y nitrógeno. Es importante remarcar el hecho, de que en ninguno de los casos fue

detectable el elemento Ti, que se supondría debería detectarse. Lo anterior podría explicarse debido a la baja concentración de titanio en las películas.

Tabla 3.4. Análisis elemental (at%) por XPS de las películas de materiales compuestos con partículas de Ti tratadas y no tratadas.

Elemento	SPU-G/5% Ti	SPU-G/5% Ti*
Carbono	91.3	91.1
Oxígeno	7.3	6.3
Nitrógeno	1.4	2.6

Ti\* corresponde al titanio con el tratamiento acido-oxidativo (activado)

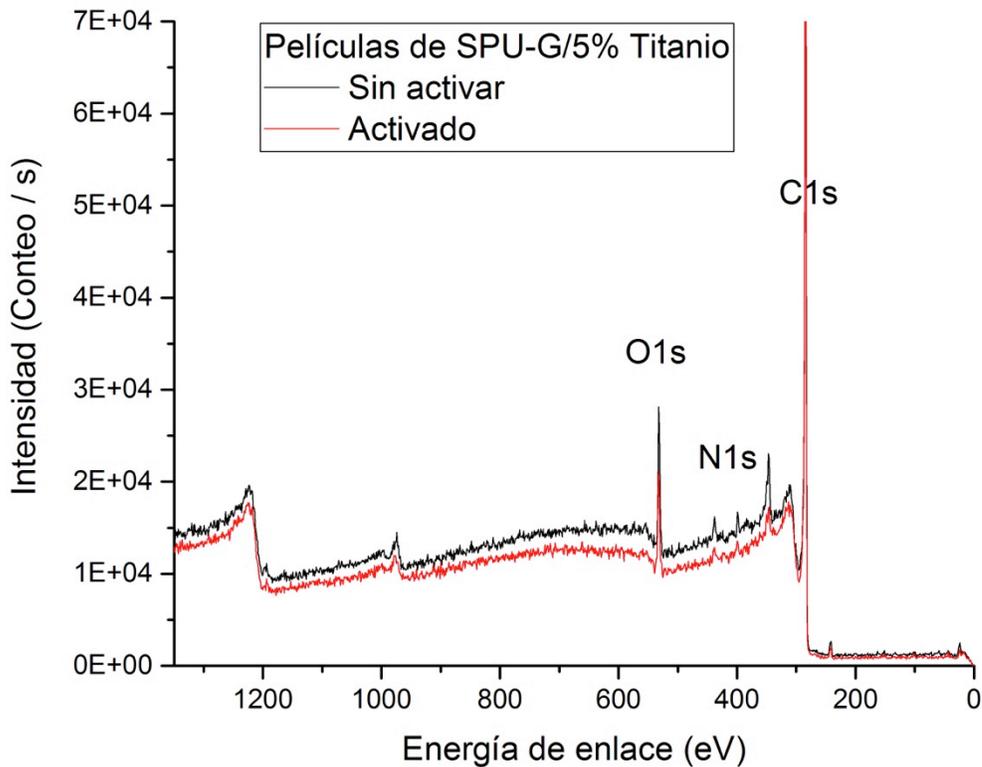


Figura 3.19. Espectros XPS de las películas de SPU-G/5% Ti, no activado y activado.

### 3.2.1.6. TGA

Los termogramas TGA de los materiales compuestos de SPU-G y titanio muestran un comportamiento de degradación térmica, con una temperatura de descomposición principal ( $T_d$ ) entre los 300° y 350 °C, que se relaciona con la degradación de los enlaces uretano

[65,93]. Una segunda caída de la masa residual se registra cercana a los 450 °C, y se relaciona con la degradación de la cadena principal de enlaces de carbono del segmento rígido. Ninguna de estas temperaturas parece afectarse por la presencia o el aumento en la concentración de las partículas de titanio, contrastando con algunos reportes en la literatura, que proponen la existencia de una reacción catalítica a consecuencia del titanio, la cual podría acelerar la degradación térmica del SPU-G [90]. Las figuras a continuación, resumen los hallazgos mencionados anteriormente: la figura 3.20 presenta la masa residual contra la temperatura, y la 3.21 la primera derivada de la masa residual contra la temperatura. La temperatura máxima a la que fue llevada la prueba fue de 650 °C, lo cual se encuentra lejos de la  $T_m$  del titanio reportada a 1668 °C. Como se presenta en el inserto de la figura 3.20, se puede observar que posterior a la degradación térmica hasta los 650 °C, la masa final de los materiales fue de 0.9%, 2.1%, 2.5% y 5.9% para los materiales de SPU-G, SPU-G/1% Ti, SPU-G/3% Ti y SPU-G/5% Ti respectivamente. El titanio residual (Ti R) que puede calcularse restando la masa final del PU proporcionalmente para cada material, concuerda con la composición inicial de contenido de partículas de titanio.

Tabla 3.5. Parametros relacionados con la degradación térmica por TGA.

<b>Material</b>	<b>T<sub>d1</sub></b> °C	<b>T<sub>d2</sub></b> °C	<b>Masa Residual</b> %	<b>Ti Residual</b> %
<b>SPU-G</b>	351	461	0.9	-
<b>SPU-G/1% Ti</b>	346	442	2.1	1.2
<b>SPU-G/3% Ti</b>	344	438	2.5	1.6
<b>SPU-G/5% Ti</b>	346	436	5.9	5.0

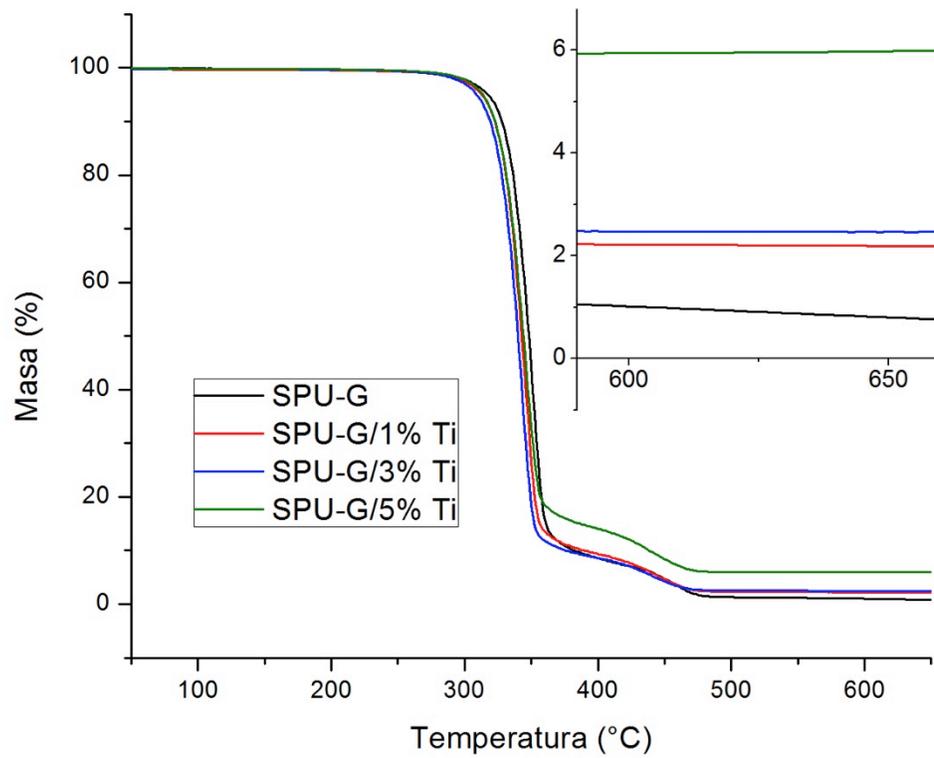


Figura 3.20. Termograma de masa en función de temperatura de las películas por TGA.

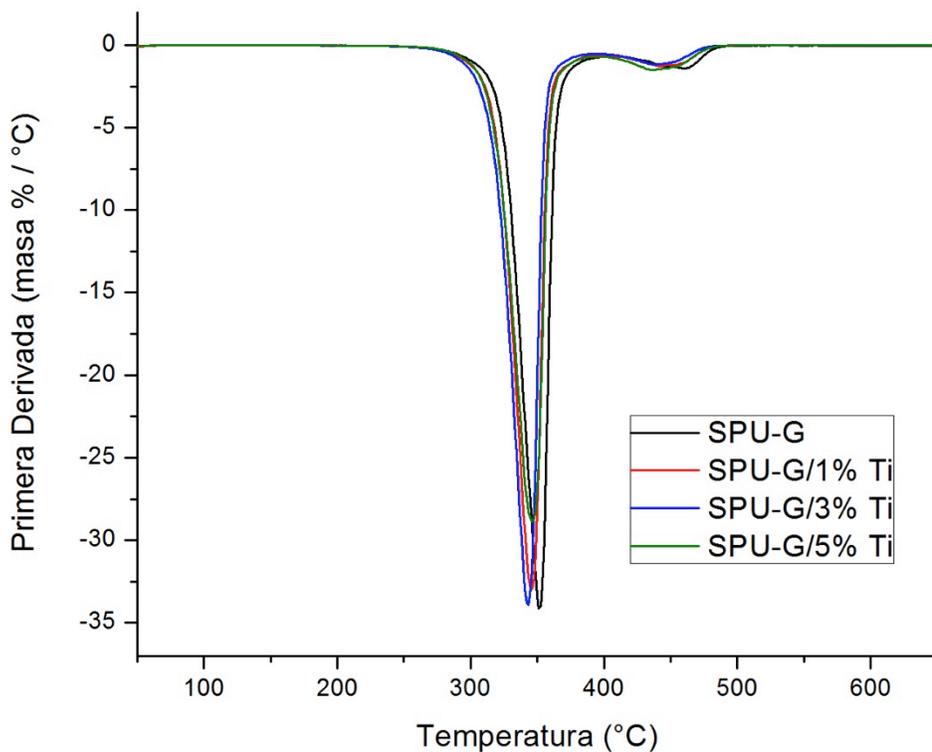


Figura 3.21. Termograma de la primera derivada de la masa de las películas por TGA.

### 3.2.1.7. DMA

Los termogramas DMA muestran una caída del módulo de almacenamiento entre los  $-40^{\circ}$  y los  $-20^{\circ}$  °C, sugiriendo una temperatura de transición alfa ( $T_{\alpha}$ ) en este intervalo de temperatura. La  $T_{\alpha}$  asociada a la  $T_g$  de los materiales, se localizó a  $-40$ ,  $-39$ ,  $-43$  y  $-37^{\circ}$  °C para los materiales SPU-G, SPU-G/1% Ti, SPU-G/3% Ti y SPU-G/5% Ti respectivamente (ver tabla 3.6). Según la literatura la  $T_g$  de la PCL se localiza a los  $-60^{\circ}$ °C, por lo que su corrimiento a más altas temperaturas sugiere que el polímero pierde movilidad al ser incorporado al poliuretano. Sin embargo, esta temperatura parece no sufrir algún cambio al incluir o aumentar las partículas de titanio. Las gráficas del módulo de almacenamiento y  $\tan \delta$  se presentan a continuación en las figuras 3.22 y 3.23.

Adicionalmente, el módulo de almacenamiento que presentan las películas de SPU-G y los materiales compuestos a 25°C se reporta en la tabla 3.6, en la cual se observa un aumento en el módulo de almacenamiento de los materiales compuestos de 1% y 3% de contenido de titanio, probablemente debido a un efecto de reforzamiento del material por parte de las partículas de titanio. Sin embargo, el material compuesto de 5% de titanio mostró un valor similar al del polímero puro, lo cual pudo haber ocurrido como efecto de la concentración de esfuerzos como efecto de la mayor cantidad de partículas en el material.

Tabla 3.6. Propiedades dinámico mecánicas obtenidas del análisis DMA.

<b>Material</b>	<b>T<sub>α</sub></b> °C	<b>Módulo de Almacenamiento</b> MPa
<b>SPU-G</b>	-40	112.6
<b>SPU-G/1% Ti</b>	-39	170.8
<b>SPU-G/3% Ti</b>	-43	172.4
<b>SPU-G/5% Ti</b>	-37	116.1

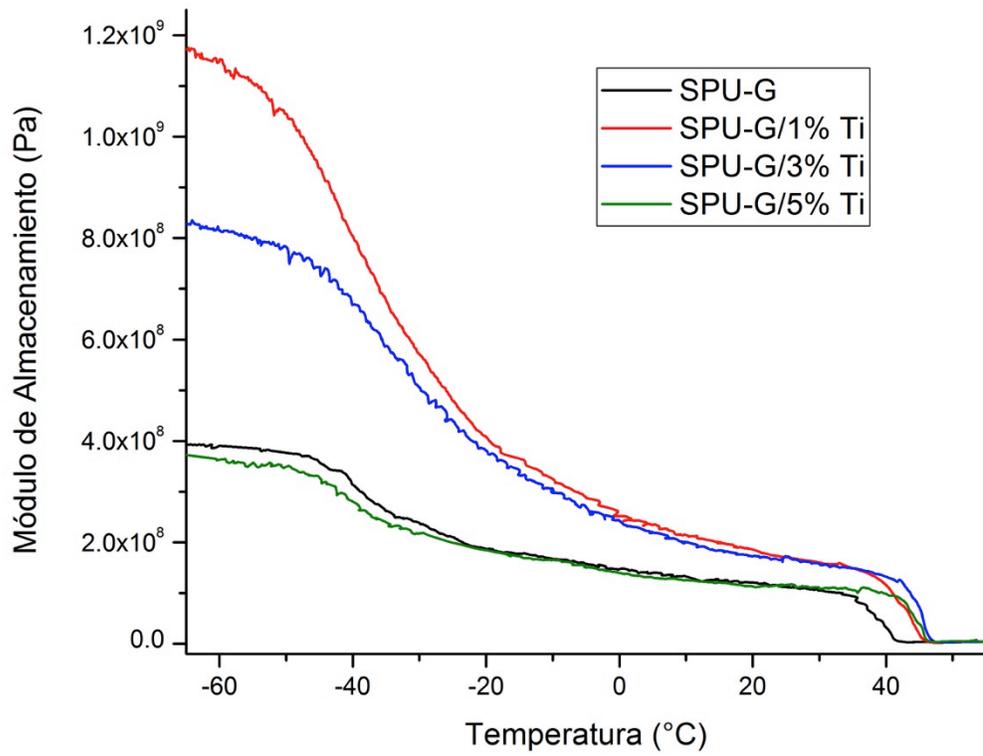


Figura 3.22. Termograma de DMA. Variación de módulo de almacenamiento con la temperatura de materiales compuestos de poliuretano y titanio.

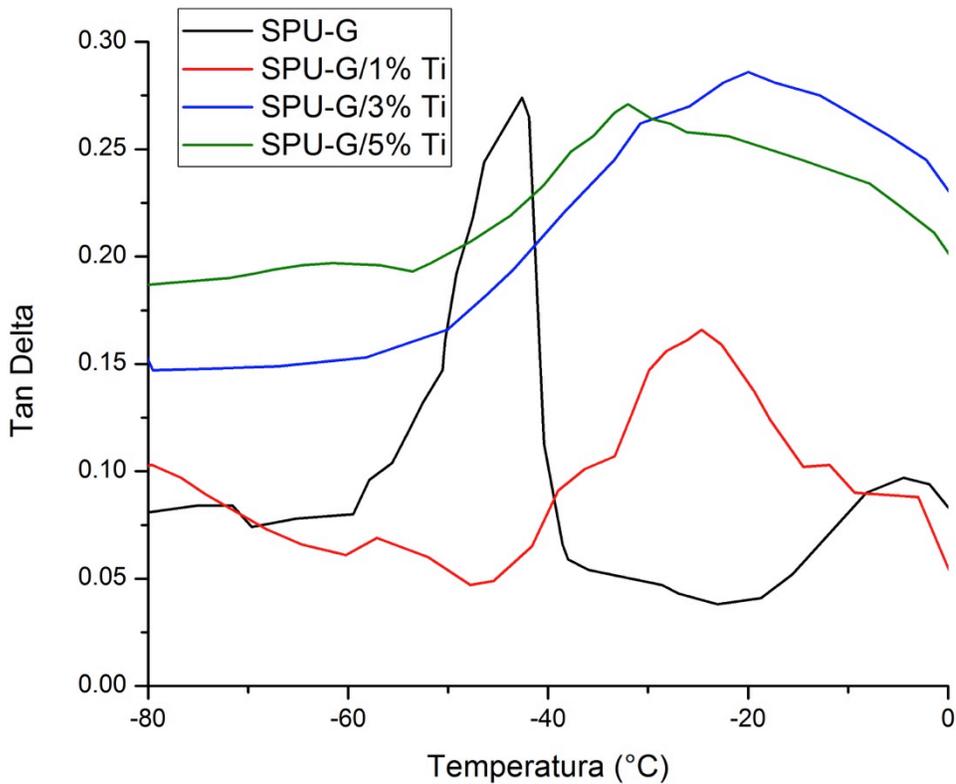


Figura 3.23. Termograma de DMA. Variación de Tan  $\delta$  con la temperatura de materiales compuestos de poliuretano y titanio.

### 3.2.1.8. DSC

Los termogramas por DSC muestran que el SPU-G y los materiales compuestos de SPU-G y titanio son semicristalinos, mostrando una temperatura de fusión ( $T_m$ ) a 52°C (ver figura 3.24). Esta temperatura no se ve afectada por la inclusión o el aumento en la concentración de las partículas de titanio. Debido a que ni la  $T_m$  ni  $\Delta H$  cambian con el contenido de las partículas, es posible que las mismas no actúan como agentes nucleantes, ni interfieren con el proceso de cristalización.

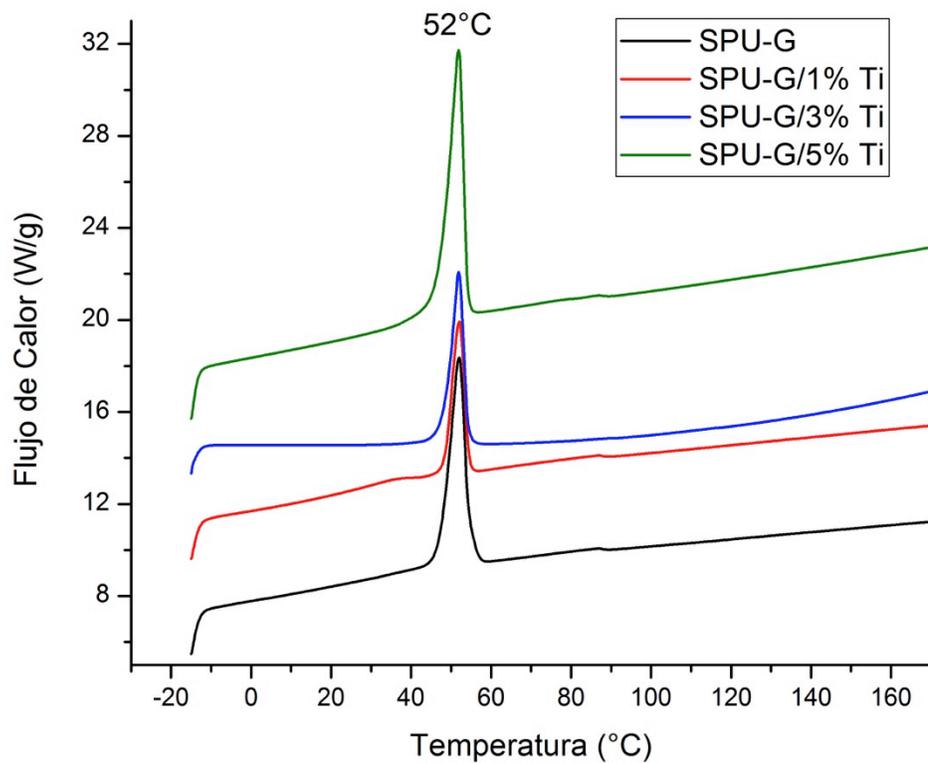


Figura 3.24. Termograma DSC de las películas de SPU-G y materiales compuestos.

### 3.2.1.9. DRX

Los difractogramas de rayos X de las películas de los materiales compuestos mostraron reflexiones típicas para PCL a  $23.6^\circ$  y  $21.3^\circ$ , como se observa en la figura 3.25 [48,94,95]. En los materiales compuestos, los picos de la PCL se vuelven de menor intensidad a medida que la concentración de partículas de titanio aumenta, mientras que los picos típicos asociados al titanio a  $35.1^\circ$ ,  $38.4^\circ$  y  $40.2^\circ$  aumentan de intensidad [78].

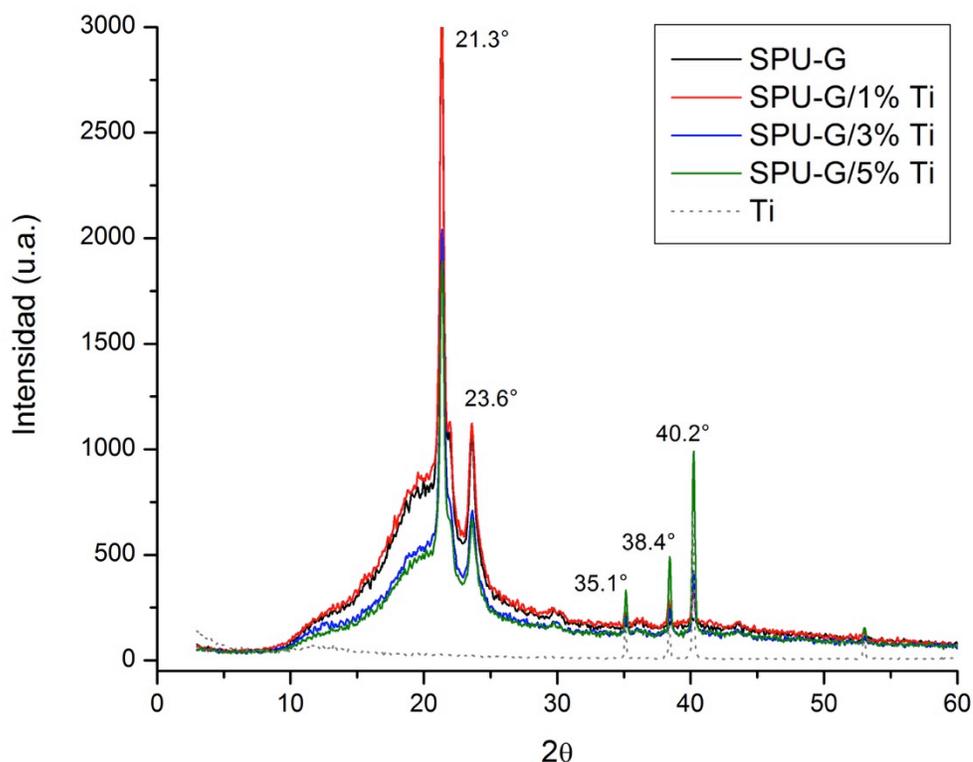


Figura 3.25. Difractograma DRX de las películas de SPU-G y Ti.

### 3.2.1.10. SAXS

Las gráficas de los datos obtenidos del SAXS (ver figura 3.26) permiten el cálculo de  $L$  de acuerdo a lo reportado previamente en la literatura [96]. Para tal efecto se realizó el tratamiento detallado en la metodología y se obtuvieron los datos presentados en la figura 3.27. Los valores de  $L$  obtenidos se presentan en la tabla 3.6. En este sentido, se observó un menor valor de  $L$  para la PCL mientras que el mayor valor lo presentó el SPU puro, y valores ligeramente menores al polímero puro para los materiales compuestos, en congruencia con los reportados en la literatura [96]. Según los resultados obtenidos las moléculas de PCL se encuentran mejor ordenadas, concordando con la cristalinidad asociada a la PCL. El valor menor de  $L$  para el SPU-G se debe probablemente a la formación del poliuretano y la presencia del segmento flexible, ocupando un mayor espacio

entre los arreglos moleculares. Los valores intermedios de los materiales compuestos de SPU-G y Ti podrían deberse a algún efecto de arreglo molecular del poliuretano a nivel nanométrico, ocasionado por la incorporación de las partículas de titanio.

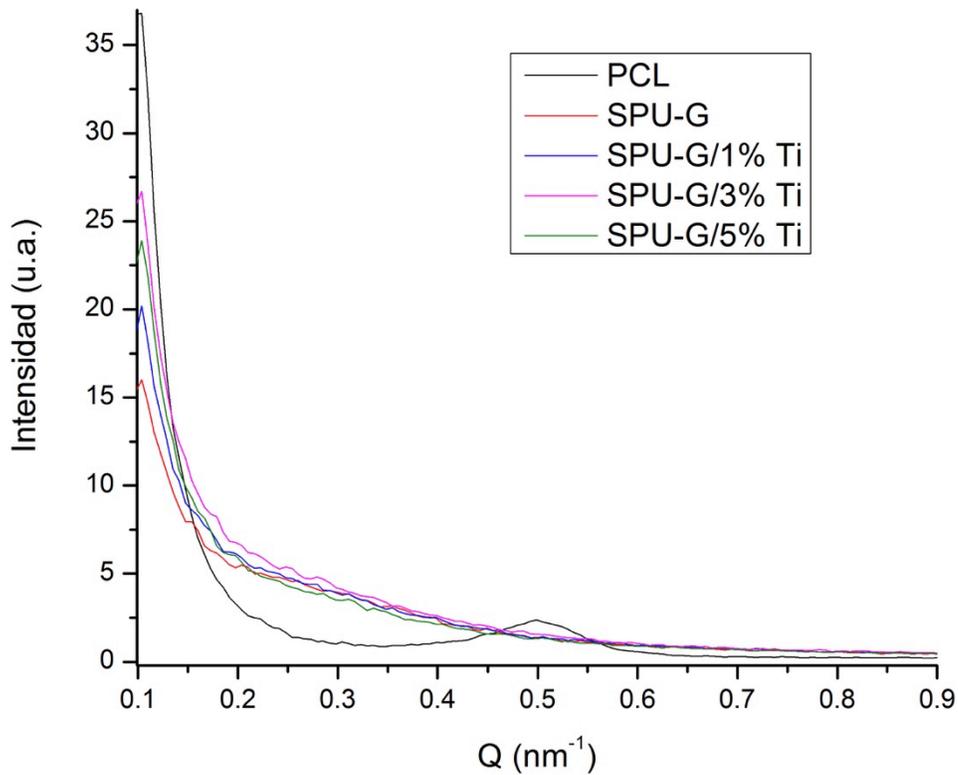


Figura 3.26. Gráfica de SAXS (datos obtenidos del equipo) de PCL, y películas de SPU-G y materiales compuestos de SPU-G y Ti.

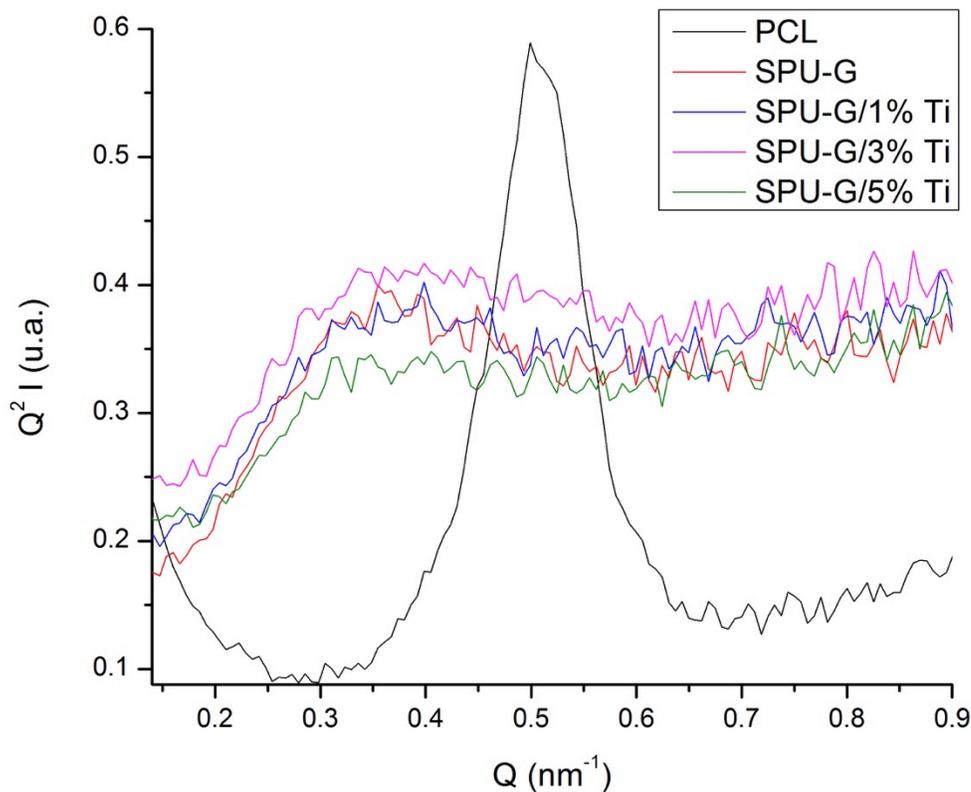


Figura 3.27. Gráfica de SAXS (datos tratados matemáticamente) de PCL, y películas de SPU-G y materiales compuestos de SPU-G y Ti.

Tabla 3.6. Valores de L para PCL y películas de los materiales de SPU-G y Ti.

Material	L nm
PCL	12.6
SPU-G	17.7
SPU-G/1% Ti	15.7
SPU-G/3% Ti	15.7
SPU-G/5% Ti	15.5

### 3.2.1.11. Porcentaje de Cristalinidad

Los porcentajes de cristalinidad de los materiales fueron calculados por DSC y DRX, y se presentan en la tabla 3.7. Estos valores se encuentran en concordancia con valores obtenidos previamente y reportados en la literatura [95]. La cristalinidad del SPU-G es

atribuida a la PCL, y no varía significativamente entre los materiales ni entre las técnicas de determinación.

Tabla 3.7. Cristalinidad porcentual de los materiales.

Material	$\Delta H_f$	Cristalinidad por DSC	Cristalinidad por DRX
	J g <sup>-1</sup>	%	%
SPU-G	40.9	40	40
SPU-G/1% Ti	39.8	39	39
SPU-G/3% Ti	43.5	44	42
SPU-G/5% Ti	37.7	39	36

### 3.2.1.12. Ángulo de Contacto

Las superficies de los materiales compuestos mostraron poseer una baja energía superficial al presentar ángulos de contacto elevado, concordante con la hidrofobicidad asociada a la PCL del poliuretano. Las mediciones de los ángulos de contacto para cada medio sobre las superficies de los materiales se muestran en la tabla 3.8. La hidrofobicidad asociada a la PCL ha sido ampliamente reportada en estudios de PU para aplicaciones biomédicas [9], y podría estar asociada a una menor proliferación celular sobre las superficies hidrofóbicas, en comparación con las superficies hidrofílicas [97]. Adicionalmente, el aumento en la concentración de las partículas de Ti en los materiales compuestos produce un incremento en los ángulos de contacto, probablemente debido a un cambio en la topografía superficial de las películas, como efecto de la presencia de las partículas de Ti.

Tabla 3.8. Ángulos de contacto de las superficies de las películas de PU/Ti.

Material	Agua (°)	PBS (°)	Medio de Cultivo (°)
SPU-G	72.7 ± 3.1	71.0 ± 3.6	71.7 ± 1.5
SPU-G/1% Ti	72.7 ± 1.2	76.3 ± 2.1	78.0 ± 3.6
SPU-G/3% Ti	73.3 ± 3.1	78.3 ± 1.5	82.0 ± 2.0
SPU-G/5% Ti	84.7 ± 3.2	82.3 ± 2.1	82.0 ± 2.0

### 3.2.2. Caracterización Mecánica de las Películas de SPU-G/Ti

Para una mejor comprensión de las propiedades mecánicas a tensión de las películas de SPU-G y Ti se realizaron pruebas mecánicas a tensión a dos velocidades de desplazamiento del cabezal.

### 3.2.2.1. Pruebas Mecánicas de Tensión a Bajas Tasas de Deformación

Los resultados de las pruebas mecánicas a tensión de las películas de SPU-G y Ti a bajas tasas de deformación, se reportan en la tabla 3.9, y las curvas esfuerzo-deformación se presentan en la figura 3.28. Los valores obtenidos son consistentes con respecto a los valores esperados y reportados en la literatura [11,94,95]. El efecto del titanio sobre este comportamiento no sugiere un reforzamiento del material, al aumentar la concentración de titanio. El esfuerzo a tensión disminuyó con la inclusión de titanio de 1.9 MPa a 1.2 MPa, lo cual sugiere una pobre interface. El cambio más importante sería la reducción de la deformación máxima de 670% para el material de SPU-G a 172% para el material de SPU-G/5% Ti, debido al aumento de las partículas de Ti. Sin embargo, el módulo elástico no mostró algún cambio estadísticamente significativo entre el material de SPU-G puro y los materiales compuestos de SPU-G y Ti. En concordancia con lo anterior, el módulo de almacenamiento registrado por DMA a 25 °C mostró que los materiales compuestos de 1% y 3% de Ti, presentaron valores mayores que el del SPU-G puro, como se reporta en la sección 3.2.1.7.

Tabla 3.9. Propiedades mecánicas a tensión de películas de SPU/Ti, con velocidad de desplazamiento de cabezal a 50 mm/min.

Material	E (MPa)	$\sigma_{\max}$ (MPa)	$\sigma_{\text{yield}}$ (MPa)	$\sigma_{\text{break}}$ (MPa)	$\epsilon_{\text{yield}}$ (%)	$\epsilon_{\text{break}}$ (%)
SPU-G	17.3 ± 1.2	1.9 ± 0.3	1.5 ± 0.1	1.9 ± 0.3	15.2 ± 0.9	671 ± 57
SPU-G/1% Ti	19.9 ± 2.9	1.8 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.8 ± 0.1	15.2 ± 0.8	537 ± 40
SPU-G/3% Ti	16.1 ± 2.5	1.7 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.7 ± 0.1	16.6 ± 2.2	499 ± 29
SPU-G/5% Ti	15.0 ± 0.6	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.8	10.7 ± 1.3	172 ± 28

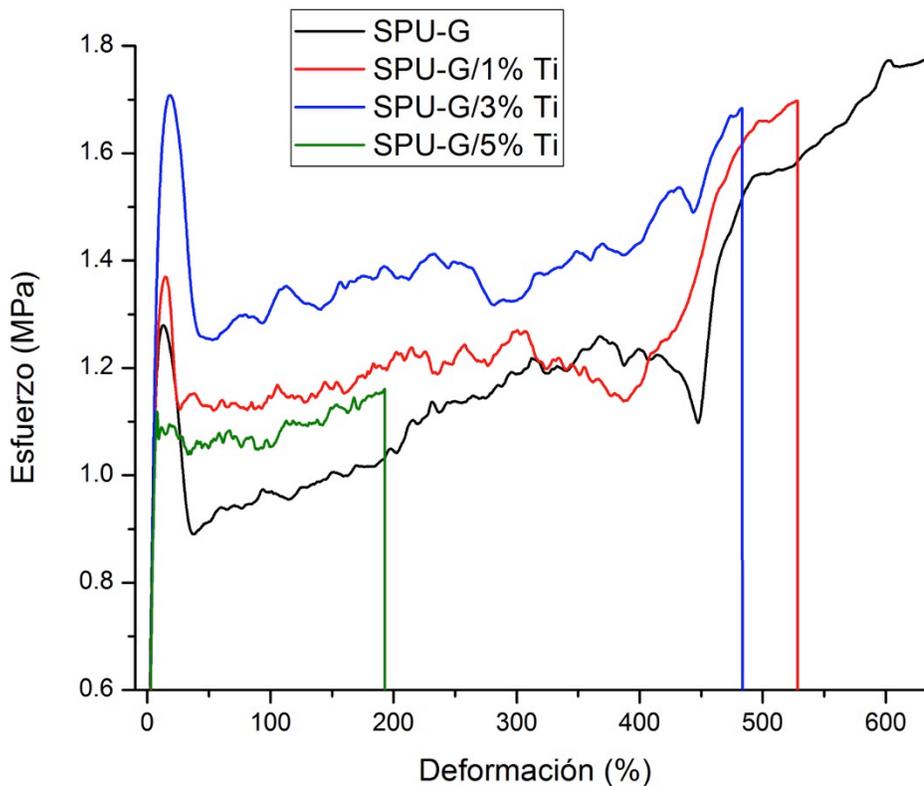


Figura 3.28. Curva esfuerzo-deformación de tensión a bajas tasas de deformación de las películas de SPU-G y materiales compuestos de SPU-G/Ti.

### 3.2.2.2. Pruebas Mecánicas de Tensión a Altas Tasas de Deformación

Los resultados de las pruebas mecánicas a tensión de las películas de SPU-G y Ti a altas tasas de deformación, se reportan en la tabla 3.10, y las curvas esfuerzo-deformación se presentan en la figura 3.29. Los valores obtenidos no sugiere un reforzamiento del material, que pudiera asociarse a la incorporación de partículas de Ti. Las pruebas a altas tasas de deformación mostraron módulos elásticos mayores para todos los materiales, al igual que mayores esfuerzos a tensión, pero deformaciones a la ruptura menores, comparados con las pruebas a bajas tasas de deformación, lo cual es un comportamiento esperado al incrementar la tasa de deformación. Sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los materiales compuestos y el polímero puro, para ninguna de las propiedades mecánicas estudiadas. En general, las propiedades mecánicas de

los materiales compuestos de SPU-G/Ti fueron menores que las obtenidas en estudios previos, que utilizaron como relleno partículas de vidrio bioactivo, a excepción del módulo elástico a bajas tasas de deformación, que fue significativamente mayor en los materiales compuestos de titanio [11]. Sin embargo, las propiedades mecánicas de los materiales estudiados de SPU-G y titanio, se encuentran por debajo de las del hueso fémur humano de 17.5 GPa, o hueso cortical de 22.1 GPa, determinadas por técnicas ultrasónicas [98].

Tabla 3.10. Propiedades mecánicas a tensión de películas de SPU-G/Ti, con velocidad de desplazamiento de 250 mm/min.

<b>Material</b>	<b>E (MPa)</b>	<b><math>\sigma_{\max}</math> (MPa)</b>	<b><math>\sigma_{\text{yield}}</math> (MPa)</b>	<b><math>\sigma_{\text{break}}</math> (MPa)</b>	<b><math>\epsilon_{\text{yield}}</math> (%)</b>	<b><math>\epsilon_{\text{break}}</math> (%)</b>
<b>SPU-G</b>	78.5 ± 6.0	8.2 ± 0.9	8.2 ± 0.9	7.2 ± 0.8	14.0 ± 1.4	223 ± 34
<b>SPU-G/1% Ti</b>	77.2 ± 4.1	7.8 ± 0.6	7.8 ± 0.6	7.1 ± 0.6	17.7 ± 0.9	185 ± 38
<b>SPU-G/3% Ti</b>	83.6 ± 4.4	8.1 ± 0.5	8.1 ± 0.5	7.4 ± 0.4	15.3 ± 1.0	221 ± 39
<b>SPU-G/5% Ti</b>	80.7 ± 3.5	8.5 ± 0.8	6.5 ± 0.3	8.5 ± 0.8	18.8 ± 0.8	223 ± 42

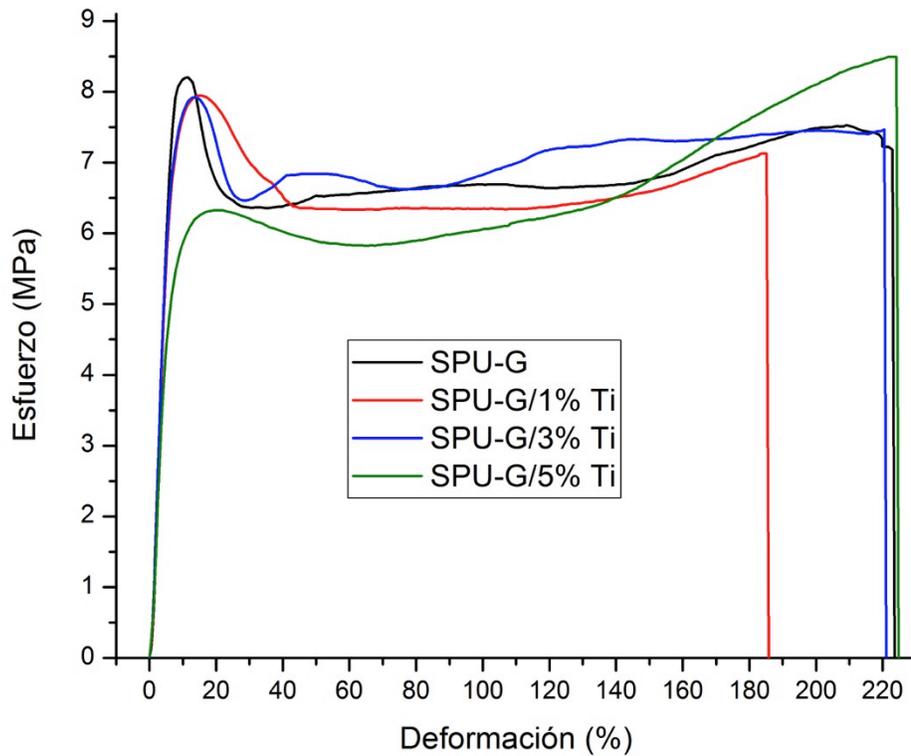


Figura 3.29. Curva esfuerzo-deformación de tensión a altas tasas de deformación de las películas de SPU-G y materiales compuestos de SPU-G/Ti.

Se realizó un ANOVA con prueba de Tukey, para determinar diferencias entre los grupos, para los esfuerzos máximos a tensión y módulo elástico de los materiales. No se encontró diferencias significativas entre grupos para los esfuerzos máximos, ni al ser evaluados individualmente, tampoco existe diferencia significativa para los módulos elásticos, ni al ser analizados individualmente. Los resultados anteriores sugieren que el titanio no actúa como refuerzo en las propiedades mecánicas del material cuando el ensayo se realiza a altas velocidades, pero tampoco las disminuye de manera significativa.

Comparando los resultados obtenidos de las pruebas de tensión a bajas y altas velocidades de desplazamiento del cabezal, nos muestran resultados concordantes con lo esperado a su naturaleza viscoelástica. Al aumentar la velocidad de desplazamiento, aumenta el módulo

elástico del material, al igual que el esfuerzo máximo. Por otra parte, al disminuir la velocidad, la deformación máxima alcanzada por los materiales antes de la ruptura aumenta considerablemente. Lo anterior podría ser explicado, ya que la matriz polimérica del material, a bajas velocidades, es capaz de fluir y reacomodarse antes de producirse la fractura del material.

Las películas de materiales compuestos de SPU-G y Ti pudieran tener una aplicación para medicina regenerativa de tejido óseo, como membranas para regeneración ósea guiada, ya que su morfología, así como sus propiedades mecánicas son similares a algunas de las membranas comercialmente disponibles para dicho propósito. Las membranas comerciales suelen presentar propiedades mecánicas a tensión entre 8 MPa y 16 MPa de módulo elástico, esfuerzo tensil máximo entre 4 MPa y 14 MPa, y deformación a la cedencia de entre 17% y 27% [99,100]. Algunas membranas de regeneración ósea guiada han sido reportada con módulos elásticos a tensión de hasta 170 MPa [100].

### 3.2.3. Pruebas de Degradación *in vitro* de las Películas de SPU-G/Ti

Las películas de los materiales compuestos de poliuretano y titanio mostraron un comportamiento de degradación total al ser sometidas a procesos de degradación acelerada *in vitro* a 100 °C por reflujo por 24 h en medio ácido y alcalinos, así como oxidativo, e incluso en el control de agua destilada (ver tabla 3.11). Los resultados de las degradaciones sugieren que la matriz polimérica podría estar siendo hidrolizada. Lo anterior concuerda con lo reportado en estudios anteriores del grupo donde se reportó la degradación en medios ácidos y alcalinos [101].

Tabla 3.11. Degradación de los materiales en diferentes medios por reflujo a 100 °C durante 24 h, reportadas como masa perdida (%).

Material	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	HCl	NaOH	NaClO	Agua Destilada
SPU-G	100	100	100	100	100
SPU-G/1% Ti	100	100	100	100	100
SPU-G/3% Ti	100	100	100	100	100
SPU-G/5% Ti	100	100	100	100	100

### **3.2.4. Ensayos de Biocompatibilidad de las Películas de SPU-G/Ti**

#### *3.2.4.1. Ensayos de Viabilidad Celular*

La adhesión celular a las películas de poliuretano y materiales compuestos con CTPDH se observó mediante microscopía fluorescente por el método de *live/dead*, siendo evidente la adhesión celular al tiempo de 24 horas, como se observa en la figura 3.30. Además, se observa que la cantidad de células adheridas aumenta al incrementar la concentración de titanio en las películas; sin embargo, para el tiempo de 10 días no se observan células sobre alguna de las películas aunque tampoco obedece a un marcaje de células muertas, por lo que se considera que los materiales son biocompatibles. Una posible explicación a esta situación sería que las células migran hacia fuera del material debido a su superficie hidrófoba [81], o posiblemente debido a que alcanzan confluencia sobre la película después de las 24 horas, lo cual produce una inhibición por contacto produciendo una desunión de las células a las películas, al ser incubadas a tiempos mayores.

Contrastando con lo anterior, en las imágenes de fluorescencia de las pruebas de viabilidad celular de las COR se observan, células adheridas a los tiempos de 24 horas y 10 días. En ambos tiempos, la cantidad de células presentes aumenta al incrementar la cantidad de titanio del material, como se observa en la figura 3.30. Se realizó un conteo por campo, de las COR adheridas a las películas de los materiales para los tiempo de 24 horas y 10 días, y los resultados de presentan en la figura 3.31. A pesar de que la cantidad de células vivas por campo aumenta con la concentración de Ti en el material, existe una disminución en el número de células entre las 24 horas y los 10 días de incubación, a excepción de la película del material SPU-G/5% Ti que mostró cantidades similares a ambos tiempos.

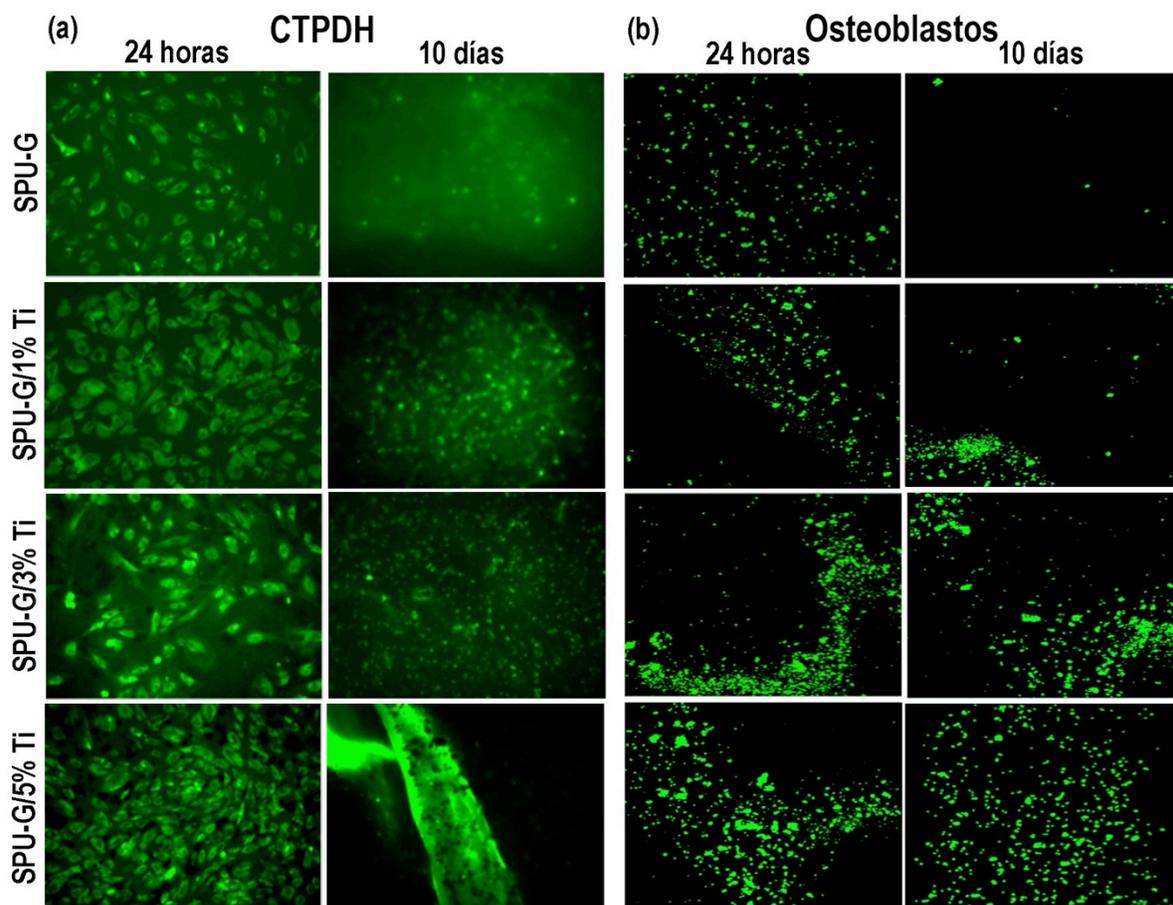


Figura 3.30. Imágenes de microscopía fluorescente de viabilidad celular para CTPDH (a), y Osteoblastos (b), a 24 horas y 10 días sobre películas de SPU-G y Ti, por el método live/dead.

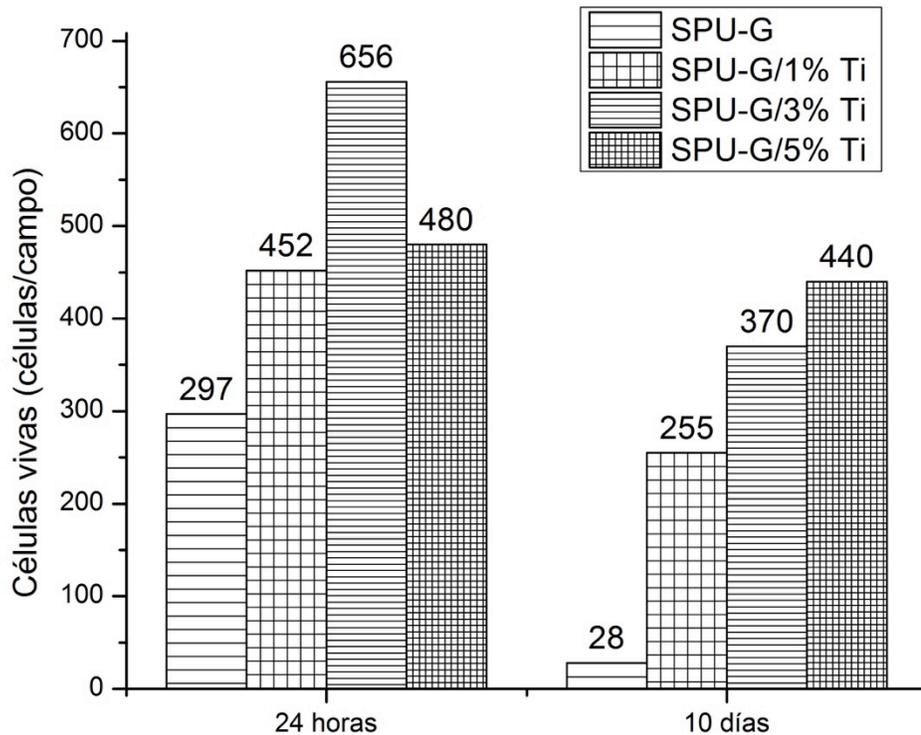


Figura 3.31. Conteo de COR por campo sobre películas de SPU-G y Ti.

#### 3.2.4.2. Ensayos de Proliferación Celular

Los ensayos de proliferación celular de CTPDH por MTT se presentan en la figura 3.32. Estos resultados muestran niveles aceptables a las 24 horas, los cuales aumentan considerablemente al día 10. Sin embargo, los niveles de absorbancia a 24 horas no muestran algún cambio estadísticamente significativo en la proliferación celular entre la película del polímero puro, y las de los materiales compuestos, incluso al aumentar la concentración de Ti presente en las películas. En la evaluación a los 10 días de incubación se observan diferencias estadísticamente significativas entre las películas, favoreciendo los niveles de proliferación celular al aumentar el contenido de titanio en las películas, a excepción de la película con 3% de titanio que fue mayor a la de polímero puro pero inferior a la de 1% de contenido de titanio [102].

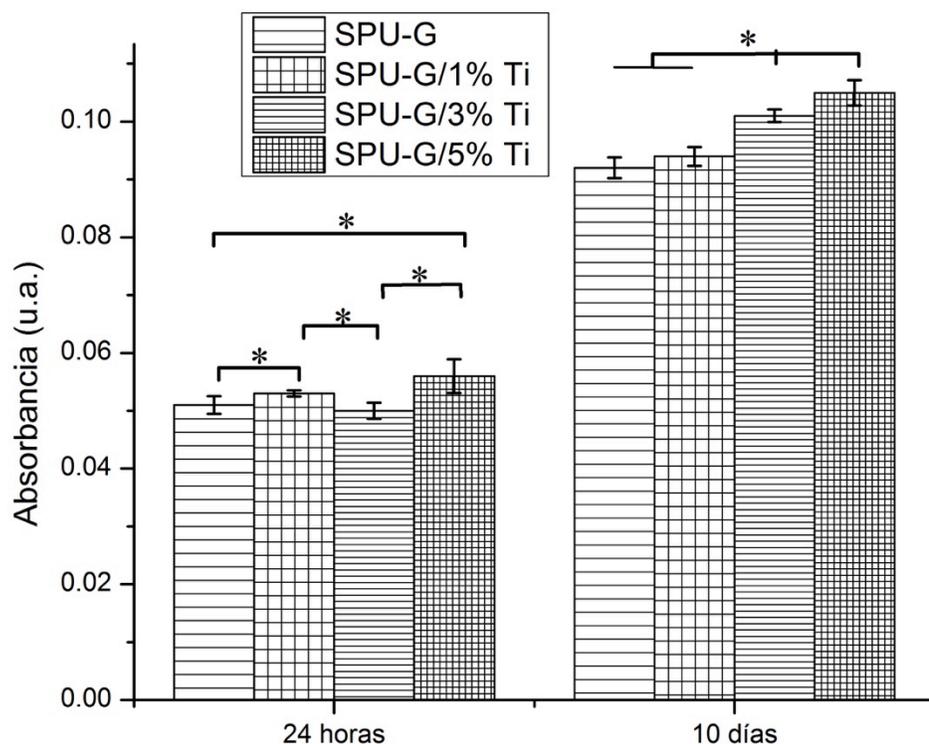


Figura 3.32. Proliferación celular de CTPDH en las películas de SPU-G y Ti. \*Indica diferencia significativa entre grupos ( $p \leq 0.05$ ).

La proliferación celular de COR determinada por ensayos con Alamar Blue (ver figura 3.33), muestra que a las 24 horas, la proliferación celular en el polímero puro fue significativamente menor con respecto a la de la película del material compuesto con 1% de contenido de titanio, al tiempo que la película con 3% de titanio fue significativamente menor que la del 1%; por su parte la película con 5% de titanio tuvo una proliferación celular significativamente mayor a las películas del polímero puro y la del 3% de titanio. A los 10 días, las películas de los materiales compuestos mostraron un incremento en la proliferación celular a mayores cantidades de titanio en la película, y las películas de 3 y 5% de contenido de titanio fueron significativamente mayores a las películas del polímero puro y la de 1% de titanio.

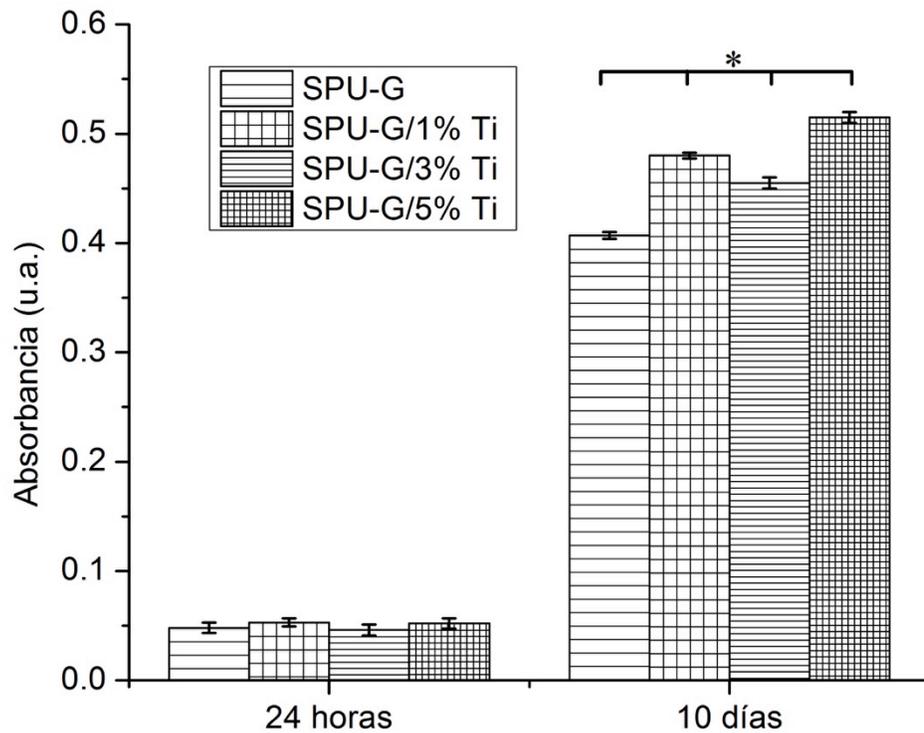


Figura 3.33. Proliferación celular de osteoblastos en las películas de SPU-G y Ti. \*Indica diferencia significativa entre grupos ( $p \leq 0.05$ ).

La rugosidad superficial [103], la química superficial [72,97], el potencial zeta y la energía superficial [104,105], han sido propuestas como factores que contribuyen a la adhesión de los osteoblastos a la superficie del titanio, pero no ha sido reportado para CTPDH [106]. Es posible que las CTPDH muestren mayores niveles de proliferación celular a tiempos menores, debido a un alto índice de proliferación, como algunas células multipotenciales [107], o debido a algún estímulo asociado al titanio.

A pesar de la buena adhesión celular a tiempos cortos mostrada por las CTPDH, fueron los osteoblastos los que mostraron una mejor proliferación celular sobre las películas, de acuerdo con los resultados por absorbancias. En general, las películas de SPU-G y materiales compuestos de SPU-G y titanio, fueron biocompatibles, y no se encontraron reacciones de citotoxicidad, por lo que podrían ser utilizadas para las aplicaciones de regeneración ósea guiada.

### 3.3. Materiales Compuestos a Base de Poliuretano y Titanio en Forma de Espuma

#### 3.3.1. Caracterización Fisicoquímica de las Espumas de PU/Ti

Siguiendo la metodología descrita fueron obtenidas las espumas de poliuretano puro y materiales compuestos de poliuretano y titanio al 1, 3 y 5%. Los materiales obtenidos se observan como típicas espumas con poros (celdas) [8,38,56,108]. La inspección visual de las espumas (ver figura 3.34) muestra que a mayor porcentaje de titanio existe una disminución en el volumen total de la espuma (altura o levantamiento máximo de la espuma), y un oscurecimiento en la coloración de la misma, pasando de un blanco amarillento para el poliuretano puro, a un gris oscuro para el material compuesto con 5% de titanio; ambas observaciones siguen un comportamiento esperado, pues el menor volumen (a mayor concentración de titanio) obedece al mayor peso de la mezcla al espumar, por tanto la expansión de la espuma es menor al polímero puro; en el caso del cambio en la coloración, éste es debido a la mayor presencia de partículas de titanio, las cuales son color gris oscuro (titanio).

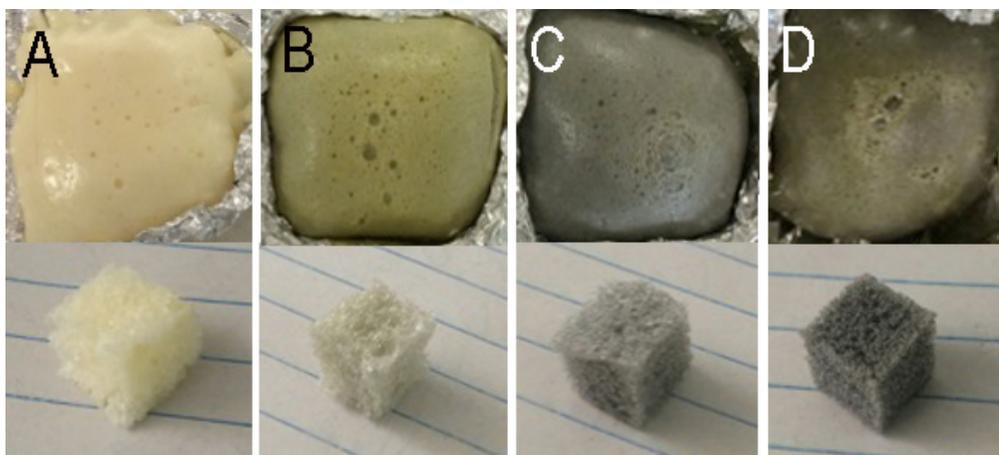


Figura 3.34. Imagen de las espumas de los materiales a) PU, b) PU/1% Ti, c) PU/3% Ti, y d) PU/5% Ti.

En estudios previos, se utilizaron cantidades menores de catalizador, con la finalidad de evitar en lo posible los efectos citotóxicos asociados al mismo. Se realizaron síntesis de espumas con cantidades porcentuales (peso/peso) menores al 0.5% de catalizador (octanoato de estaño), las cuales no produjeron espumas que fueran estables para mantener

el volumen ganado durante la reacción de polimerización con espumado. La principal característica de la síntesis fue que el prepolímero nunca alcanzaba una viscosidad mayor a la original del mezclado; posteriormente al colocar el butanodiol y el agua, la mezcla espumaba y después de ser colocada en una estufa a 120°C con presión negativa, el espumado se caía después de aproximadamente 15 min, lo que provocaba una pérdida del volumen ganado durante el espumado. La falta de viscosidad del prepolímero puede atribuirse a que la concentración del catalizador era insuficiente para una apropiada reacción de polimerización; a partir de concentraciones igual o mayores al 0.5% (p/p) el prepolímero conseguía una viscosidad aparente elevada, y el volumen del espumado se mantenía al final de la reacción, obteniendo una espuma estable.

Adicionalmente, espumas de poliuretano a base de aceite de ricino e IPDI fueron obtenidas utilizando como catalizador dibutil dilaurato de estaño al 0.5% (peso/peso), frecuentemente utilizado en la preparación de espumas de poliuretano biodegradable. Algunas propiedades de estas espumas se presentan en la tabla 3.12 [37,95], sin embargo, la utilización de este catalizador fue descartada principalmente por las pobres propiedades mecánicas de las espumas, como se presenta más adelante en la sección 3.3.2.

Tabla 3.12. Propiedades de las espumas de PU sintetizadas con distintos catalizadores al 0.5%.

<b>Catalizador</b>	<b>Tiempo de Espumado</b>	<b>Densidad</b>	<b>Porosidad</b>
	s	kg/m <sup>3</sup>	%
Octanoato de estaño	500	128 ± 7	87
Dibutil dilaurato de estaño	955	347 ± 9	65

### 3.3.1.1. Propiedades de Espumado

El tiempo de espumado fue registrado durante la polimerización de las espumas y los resultados se presentan en la tabla 3.13. Se consideró tiempo de espumado desde el inicio de la formación de las primeras burbujas, durante el mezclado final de la síntesis, hasta el momento en que dejó de aumentar el volumen de la espuma, ya dentro de la estufa a 120°C. El tiempo de espumado fue mayor en los materiales con contenido de partículas de titanio,

probablemente debido a que la presencia de las partículas de titanio dificulta la reacción química.

La densidad de las espumas se presenta en la tabla 3.13. Las densidades obtenidas coinciden con las reportadas en la literatura para espumas de poliuretanos [48], a mayor cantidad de titanio en las espumas, mayor su densidad [9].

La porosidad de la espuma del poliuretano puro fue mayor que las de los materiales compuestos, en los cuales fue disminuyendo la porosidad a medida que la concentración de titanio aumenta [37]. Esto se puede explicar, ya que la porosidad depende del volumen del espumado durante la polimerización, al haber una mayor cantidad de masa a ser desplazada (el titanio es casi tres veces más denso que el poliuretano); entonces, el volumen final de la espuma es menor. Las porosidades de los materiales se presentan a continuación.

Tabla 3.13. Propiedades de Espumado de los materiales compuestos de PU y Ti.

<b>Espuma</b>	<b>Tiempo de Espumado</b>	<b>Densidad</b>	<b>Porosidad</b>
	s	kg/m <sup>3</sup>	%
PU	500	128 ± 7	87
PU/1% Ti	635	171 ± 12	83
PU/3% Ti	620	196 ± 16	82
PU/5% Ti	600	240 ± 14	80

### 3.3.1.2. FTIR

Para fines de un mejor entendimiento de la asignación de bandas y establecer su posible origen, se realizó un análisis FTIR para los reactivos utilizados en la síntesis y se obtuvieron los siguientes espectros (figura 3.35).

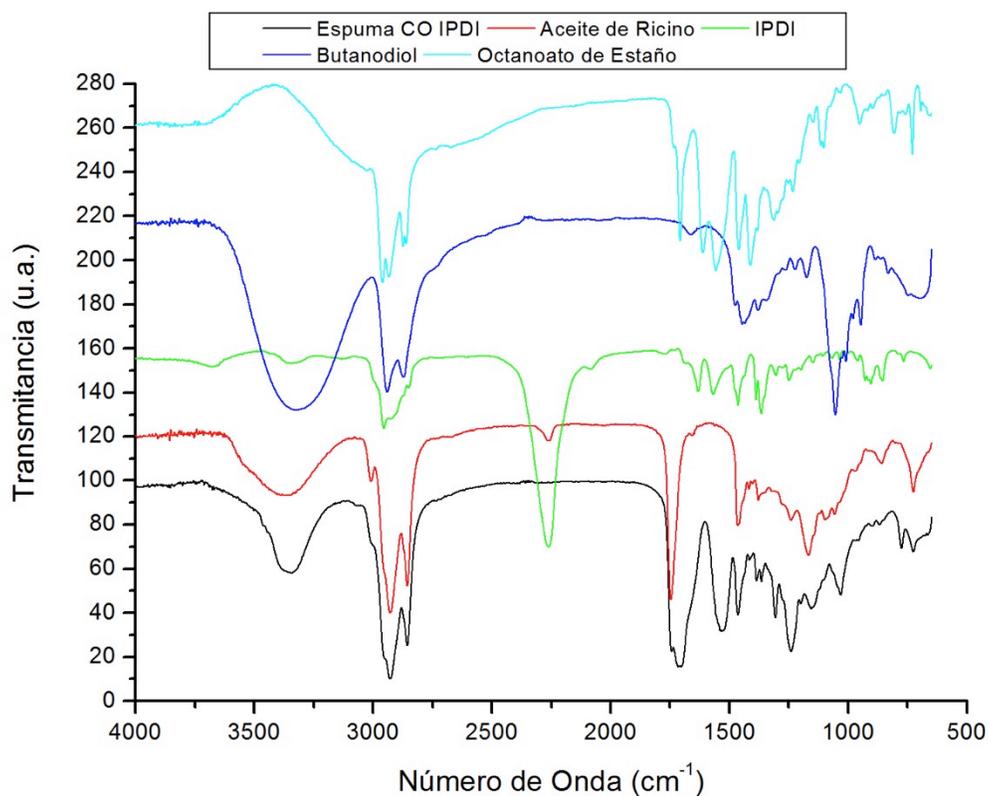


Figura 3.35. FTIR de espuma y reactivos de la síntesis.

La espectroscopía de infrarrojo confirmó la síntesis del poliuretano, al presentar bandas características en  $3356\text{ cm}^{-1}$  para grupos amina (N-H) [9],  $2923\text{ cm}^{-1}$  para los grupos metilo y  $1743\text{ cm}^{-1}$  correspondientes al grupo carbonilo (C=O). En la figura 3.36 se observa una sobreposición de los espectros de infrarrojo de las espumas de la síntesis de PU normalizado a 24 horas y 7 días con fines comparativos, y podemos observar que son coincidentes, lo que sugiere una estabilidad de la espuma durante el tiempo de observación [37].

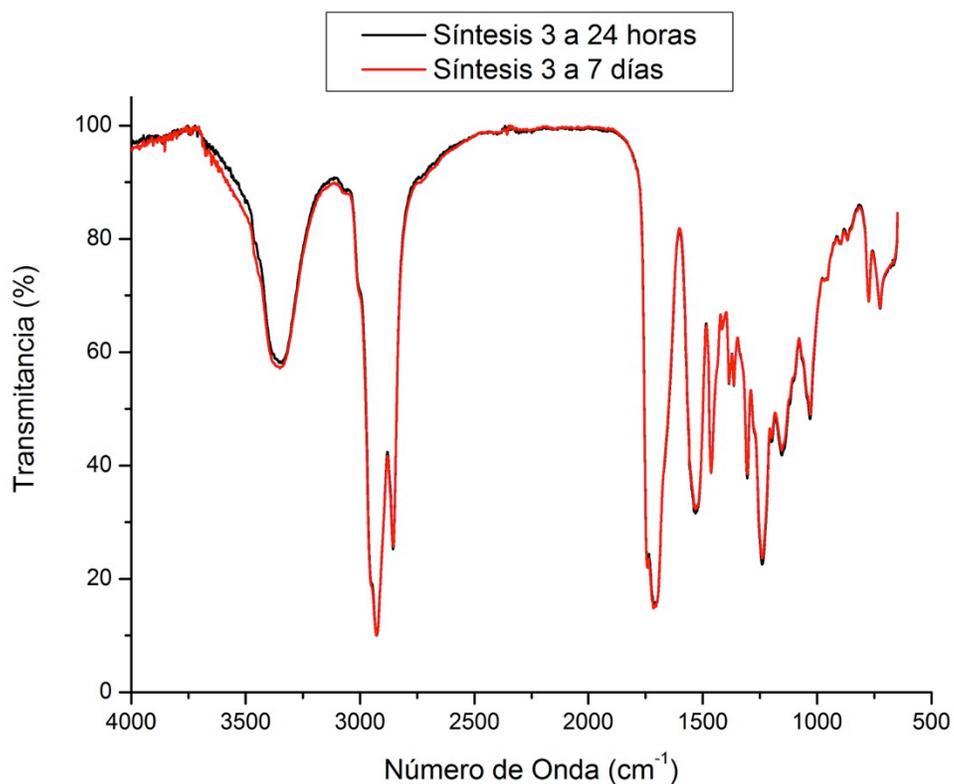


Figura 3.36. Espectros de infrarrojo de la espuma de poliuretano a 24 horas y 7 días.

Adicionalmente, no se observó la banda de  $2274\text{ cm}^{-1}$  característico de  $\text{-NCO}$  lo que sugiere que estos grupos del IPDI han reaccionado completamente durante la síntesis, por tanto, las espumas no presentan monómero residual de IPDI [37], lo que representa una característica favorable para su biocompatibilidad, ya que los residuos monoméricos generalmente se asocian a citotoxicidad [109].

En los materiales compuestos, las absorciones de infrarrojo fueron similares a las correspondientes a la espuma sin titanio (ver figura 3.37), donde la principal característica es la disminución en su intensidad al aumentar la concentración de Ti. Sin embargo, al tratarse de partículas de un elemento metálico estas no son registradas por FTIR, por lo que los espectros de FTIR se observan similares entre sí.

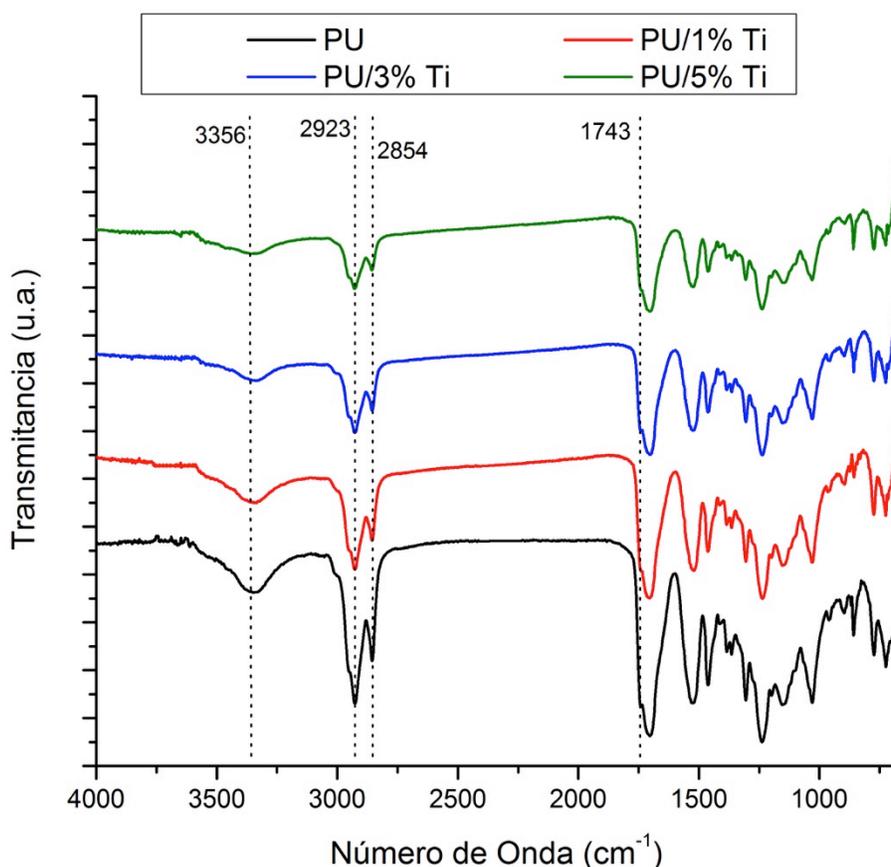


Figura 3.37. Espectro de FTIR de las espumas de los materiales compuestos.

### 3.3.1.3. Raman

El análisis Raman (figura 3.38) se realizó a las espumas de los materiales para corroborar la aparición de las bandas características asociadas al titanio. El espectro Raman de las espumas de PU muestra absorciones a  $1305$  y  $1440\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  o  $\text{C-N}$ ),  $1655\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C=C}$ ) [110,111],  $2854\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  sim) y  $2927$  ( $\text{CH}_2$  asim). Es de destacar la ausencia de bandas sobre  $2270\text{ cm}^{-1}$  que se asocia a  $\text{N=C=O}$  [112], lo que sugiere la ausencia de diisocianato residual en la espuma al final de la reacción. Estas absorciones se replican en los materiales compuestos de PU/Ti, donde adicionalmente se observaron los picos a  $417$  y  $610\text{ cm}^{-1}$  asociados al titanio. En los materiales compuestos también aparece una banda a  $775\text{ cm}^{-1}$  asociada al enlace  $\text{Ti-O-Ti}$ , lo cual pudiera estar mostrando alguna interacción entre la matriz polimérica y las partículas de Ti, ya que este pico no se presenta ni en el espectro de las partículas de Ti, ni en el de la espuma de PU puro.

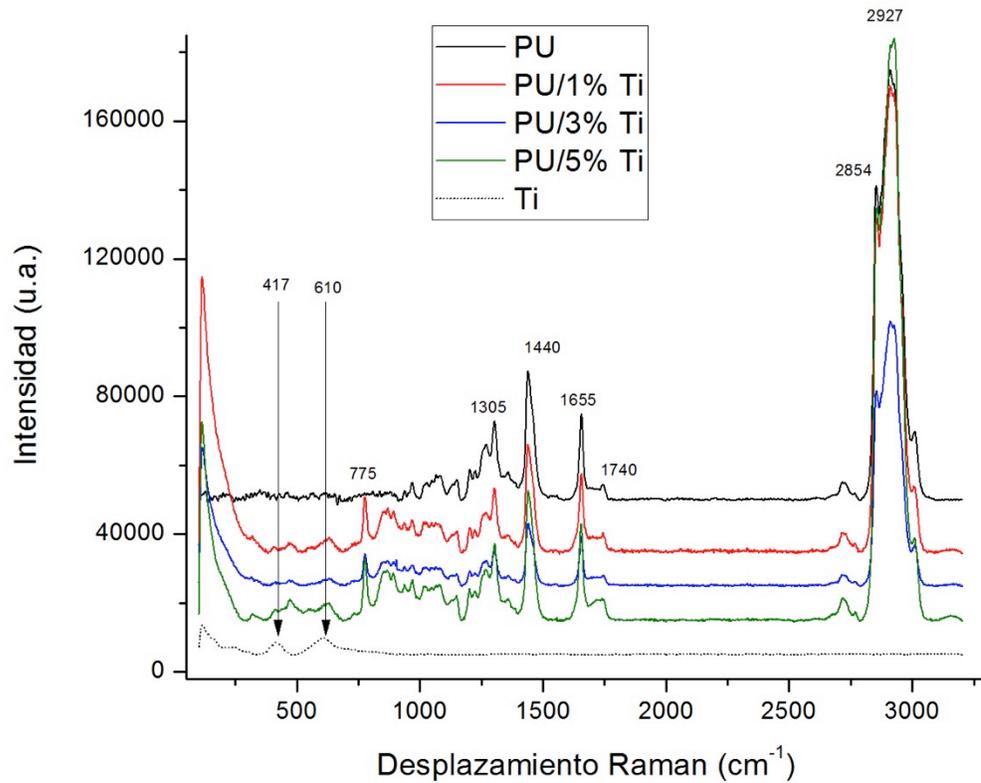


Figura 3.38. Espectro Raman de las partículas de titanio y las espumas de materiales compuestos.

#### 3.3.1.4. MEB

Las imágenes MEB muestran las espumas con porosidades aparentemente interconectadas, en escala micro para los diferentes materiales compuestos (figura 3.39).

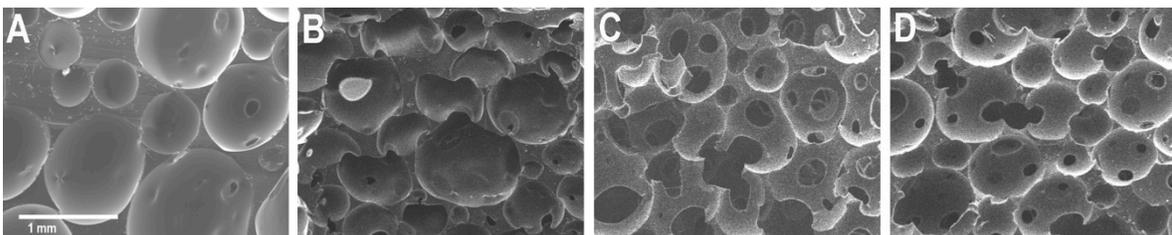


Figura 3.39. Imágenes MEB de las espumas a) PU, b) PU/1% Ti, c) PU/3% Ti, y d) PU/5% Ti.

### 3.3.1.5. EDX

El microanálisis elemental muestra presencia de los elementos típicos de los poliuretanos (tabla 3.14), de acuerdo a la composición de los reactivos originales [37,39,113]. Adicionalmente, en las espumas de los materiales compuestos de PU/Ti, presentan cantidades de Ti, que aumentan al aumentar el porcentaje de titanio presente en cada material.

Tabla 3.14. Análisis Elemental por EDX de los materiales compuestos (Wt. %).

Elemento	PU		PU/1% Ti		PU/3% Ti		PU/5% Ti	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
C	66.2	± 0.9	64.6	± 2.6	65.2	± 0.7	64.3	± 1.0
O	23.5	± 2.5	30.0	± 2.7	24.5	± 0.9	24.9	± 0.6
N	10.3	± 3.3	4.5	± 0.08	7.9	± 0.03	6.7	± 0.2
Ti	-	-	0.8	± 0.03	1.9	± 0.1	4.1	± 1.1

Los mapeos por EDX sobre las superficies de las espumas de los materiales compuestos de PU/Ti, para la detección de titanio (rojo), obtenidos con la finalidad de verificar su dispersión en el material [11] se presentan en la figura 3.40 y muestran cómo la distribución del titanio en el material es relativamente homogénea, haciéndose más evidente (intensa) la presencia del titanio a medida que el porcentaje (peso/peso) del titanio aumenta en cada material. Adicionalmente, a medida que aumenta la concentración de titanio en los materiales se puede observar una tendencia a aglomerarse.

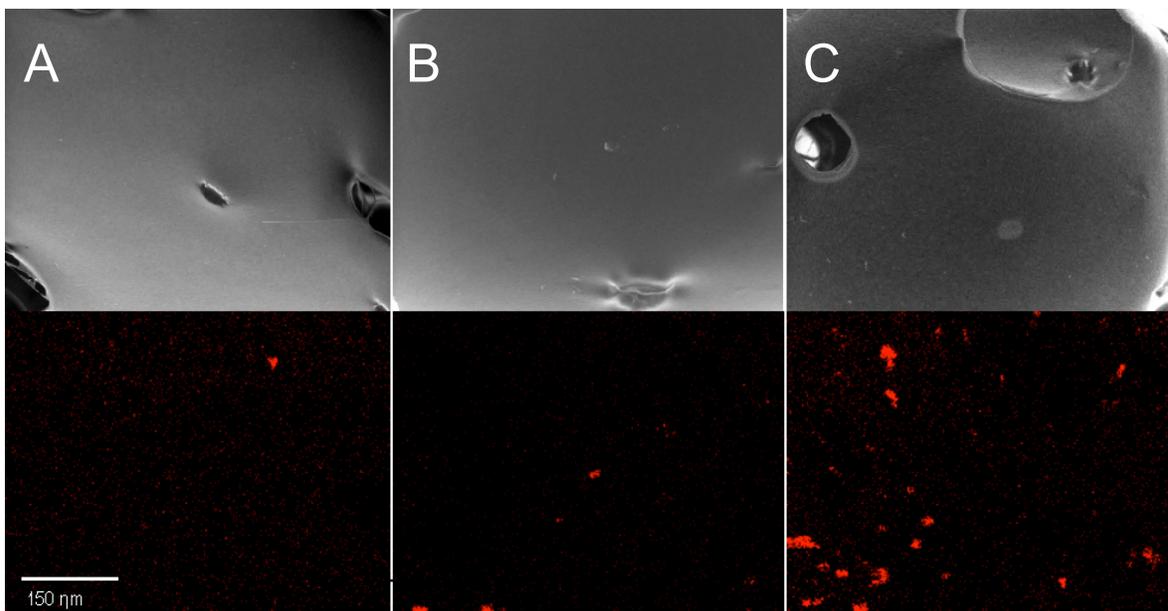


Figura 3.40. Imágenes SEM (imagen superior) con su correspondiente mapeo (imagen inferior) por EDX para titanio (rojo), de los materiales compuestos de PU/Ti al 1% (a), 3% (b), y 5% (c).

#### 3.3.1.6. XPS

Las espumas de los materiales compuestos de PU/Ti presentaron una composición elemental, determinada mediante análisis de XPS, en concordancia con la presentada por el microanálisis elemental por EDX, siendo registrados los elementos carbono (C), oxígeno (O) y nitrógeno (N), como se puede observar en la figura 3.41. Sin embargo, la ausencia de la identificación del elemento titanio en la superficie de las espumas, no es consistente con su detección mediante EDX. Se esperaba que en la superficie erosionada de las espumas se detectara la presencia de titanio. Una posible explicación para la ausencia del pico de titanio, se presenta con anterioridad en la sección 3.2.1.5 de este documento. Adicionalmente, existe la posibilidad que las partículas de titanio se encuentren totalmente recubiertas por la matriz de poliuretano, por lo que el análisis superficial podría no detectarlo. En la tabla 3.15 se presentan los porcentajes de composición elemental de las espumas de los materiales compuestos obtenidos por XPS y por EDX para su comparación.

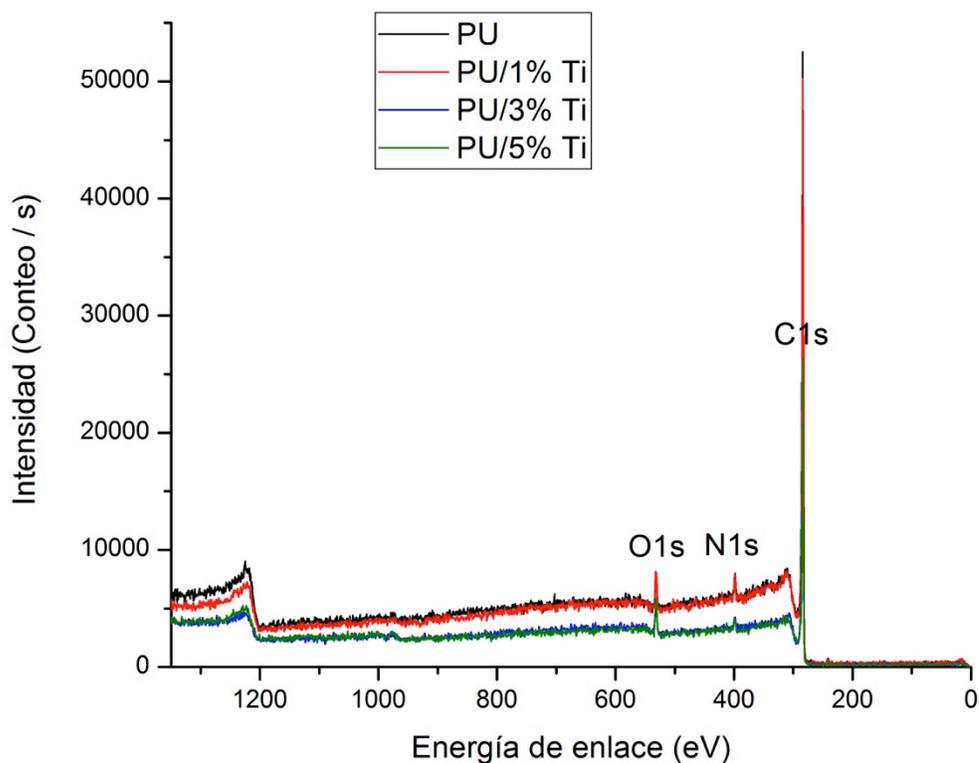


Figura 3.41. Espectros obtenidos mediante XPS de las espumas de materiales compuestos de PU/Ti.

Tabla 3.15. Composición elemental por EDX y por XPS de las espumas de materiales compuestos PU/Ti.

	Carbono		Oxígeno		Nitrógeno		Titanio	
	EDX	XPS	EDX	XPS	EDX	XPS	EDX	XPS
PU	66.2	92.0	23.5	3.9	10.3	4.1	0.0	0.0
PU/1% Ti	64.6	91.5	30.0	5.0	4.5	3.5	0.8	0.0
PU/3% Ti	65.2	90.8	24.5	6.8	7.9	2.4	1.9	0.0
PU/5% Ti	63.3	92.2	24.9	7.5	6.7	0.3	4.1	0.0

### 3.3.1.7. TGA

El análisis por TGA de las espumas muestra un comportamiento característico de la degradación térmica de los poliuretanos (ver figura 3.42), con picos correspondientes a la degradación de los enlaces uretano a 330°C, la degradación del segmento flexible del polioliol

a 370°C, y a la degradación del segmento rígido a 450°C, como se observan en la figura 3.43 [65,93,113]. Los materiales compuestos muestran que al final del calentamiento (650°C) se presentan una masa residual (R) en porcentajes similares a su contenido de titanio. Esto es, a estas temperaturas el titanio ( $T_m = 1668^\circ\text{C}$ ) [74] es estable.

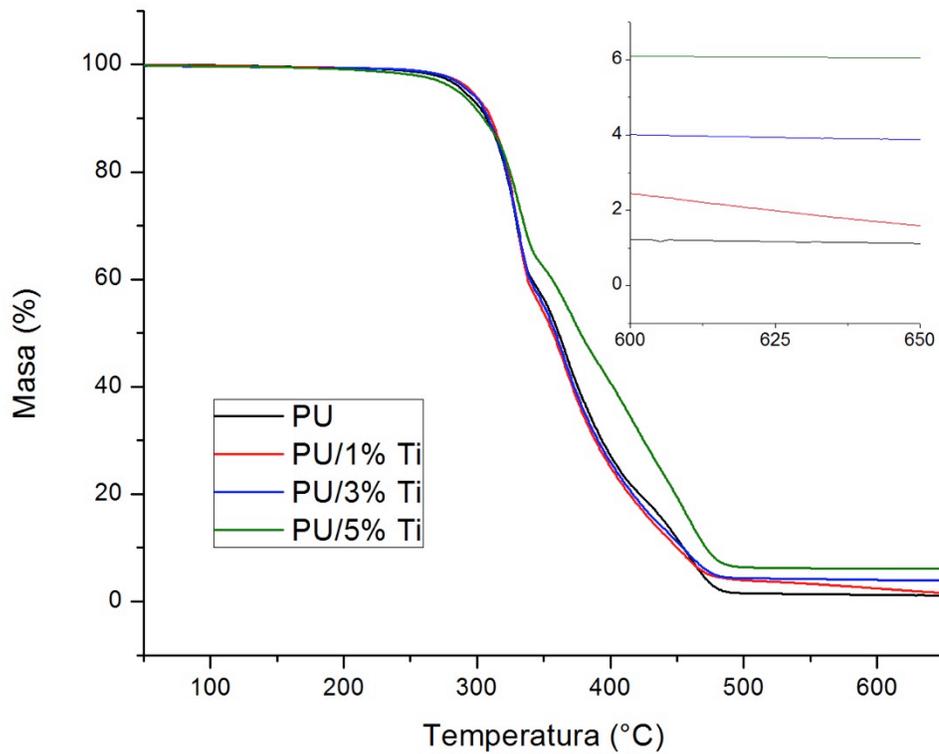


Figura 3.42. Termograma de masa contra temperatura del TGA de espumas de materiales compuestos.

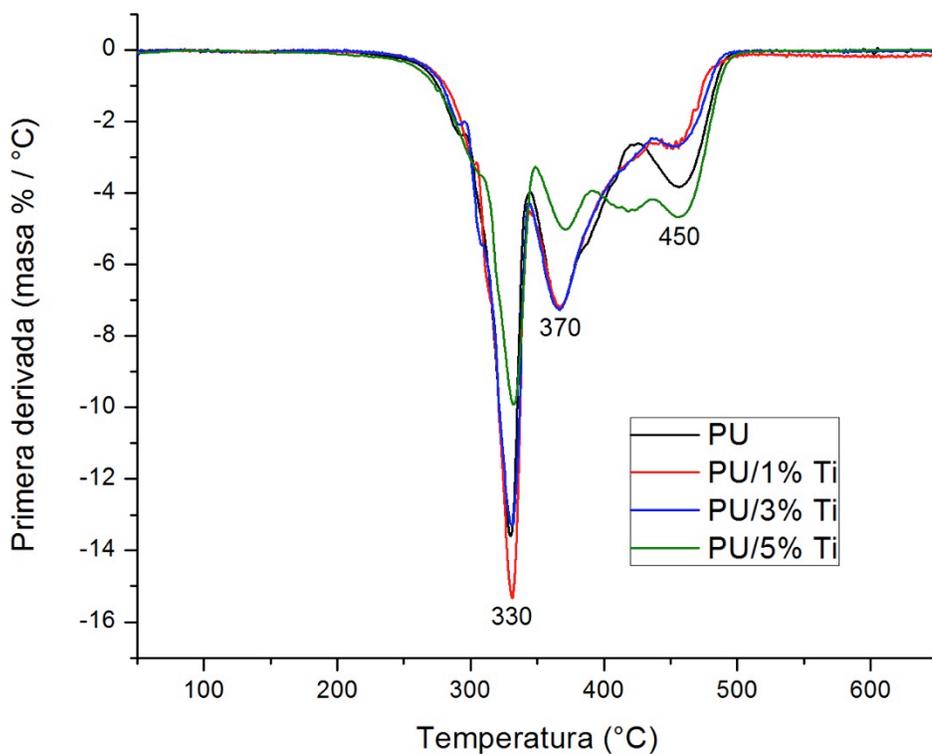


Figura 3.43. Primera derivada de la masa contra temperatura del TGA de espumas de materiales compuestos.

Tabla. 3.16. Resumen propiedades de degradación térmica por TGA.

	$T_{d1}$ (°C)	$T_{d2}$ (°C)	$T_{d3}$ (°C)	MR (%)	Ti R (%)
<b>PU</b>	330	367	456	1.1	-
<b>PU/1% Ti</b>	330	366	452	1.7	0.6
<b>PU/3% Ti</b>	330	366	454	3.8	2.7
<b>PU/5% Ti</b>	332	370	454	6.1	5.0

### 3.3.1.8. DMA

El análisis DMA muestra una posible temperatura de relajación alfa ( $T_{\alpha}$ ) del material (ver figura 3.44) a los 40°C para las espumas de PU y materiales compuestos, sin presencia aparente de desplazamiento por la incorporación de titanio. Los materiales presentan una disminución de propiedades mecánicas a partir de los 20°C, (ver figura 3.45) para las

espumas de PU, PU/1% Ti, a los 22°C para la espuma de PU/3% Ti y de los 30°C para la espuma de PU/5% Ti, que coinciden con lo revisado en lo reportado por Li et al. (2015) quien obtuvo espumas de poliuretano a base de CO, las cuales presentaron decaimiento del módulo del almacenamiento por DMA a partir de los 25°C [45]. La temperatura de transición vítrea de un polímero para utilizarse en el cuerpo humano debe ser lo suficientemente alta para proporcionar rigidez estructural estable durante su uso. Sin embargo, las espumas estudiadas muestran un decaimiento en sus propiedades mecánicas a partir de los 20°C, lo que implicaría que a 37°C de la temperatura del cuerpo humano, dichas propiedades no estarían en sus niveles idóneos, además de que el material estará por encima de su  $T_g$ . La presencia del titanio no mostró afectar la  $T_g$ , por lo menos no en las concentraciones estudiadas. En la tabla 3.17 se presentan los módulos de almacenamiento de las espumas a 37°C.

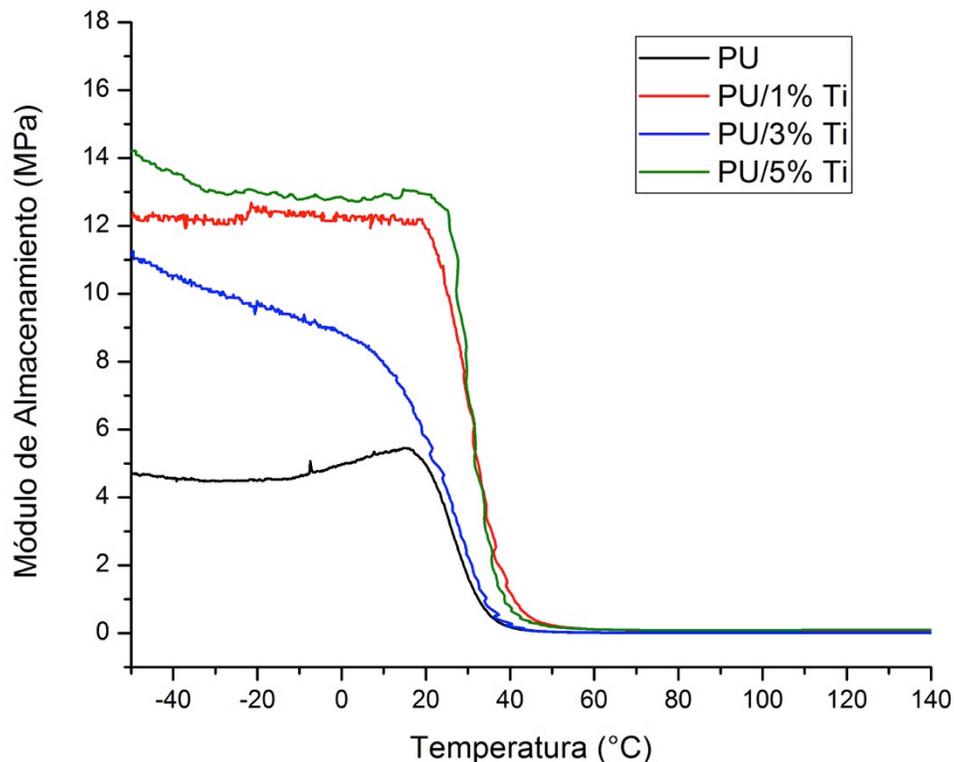


Figura 3.44. Termograma de DMA de las espumas de poliuretano y titanio. Módulo de almacenamiento vs. temperatura.

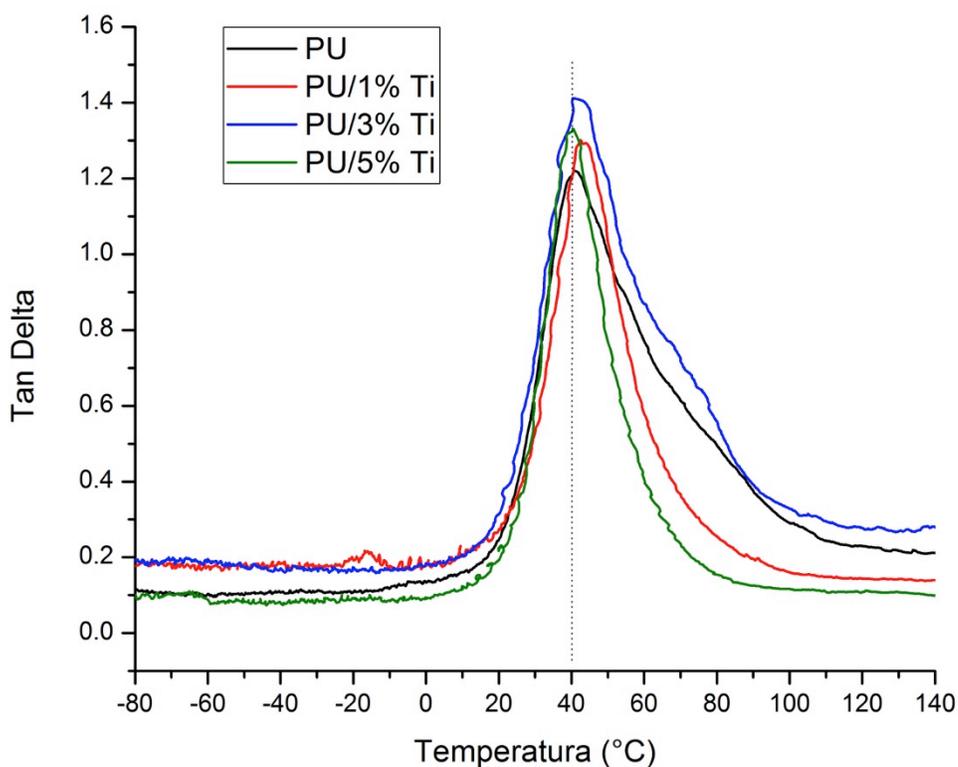


Figura 3.45. Termograma de DMA de las espumas de poliuretano y titanio. Tan  $\delta$  vs. temperatura.

Tabla 3.17. Módulos de almacenamiento,  $E'$ , de las espumas de PU y PU/Ti por DMA.

	$E'$ 25°C (kPa)	$E'$ 37°C (kPa)	$E'$ 60°C (kPa)
<b>PU</b>	3,460	350	20
<b>PU/1% Ti</b>	10,020	1,980	120
<b>PU/3% Ti</b>	4,230	580	20
<b>PU/5% Ti</b>	12,820	1,480	110

### 3.3.1.9. DSC

El análisis de DSC de las espumas de los materiales compuestos (figura 3.46) muestra una inflexión asociada a la  $T_g$  de los materiales a temperaturas entre los 13°C y los 18°C. Además, no existe evidencia de alguna transición de baja temperatura asociada, ya sea a fusión o cristalización, coincidiendo con lo reportado en la literatura [37,113]. Sin embargo,

aunque la muestra fue entrecruzada, lo cual produce una dificultad para el ordenamiento molecular y la formación de esferulitas de cristalización [37,113], la variación en la  $C_p$  no indica un cambio en el grado de entrecruzamiento. La  $T_g$  de los materiales se ubicaron a 17.3, 17.9, 13.6 y 13.7°C para los materiales de PU, PU/1% Ti, PU/3% Ti y PU/5% Ti respectivamente. Lo anterior sugiere que los materiales compuestos son amorfos, y que las partículas de Ti no actúan como agentes nucleantes [113].

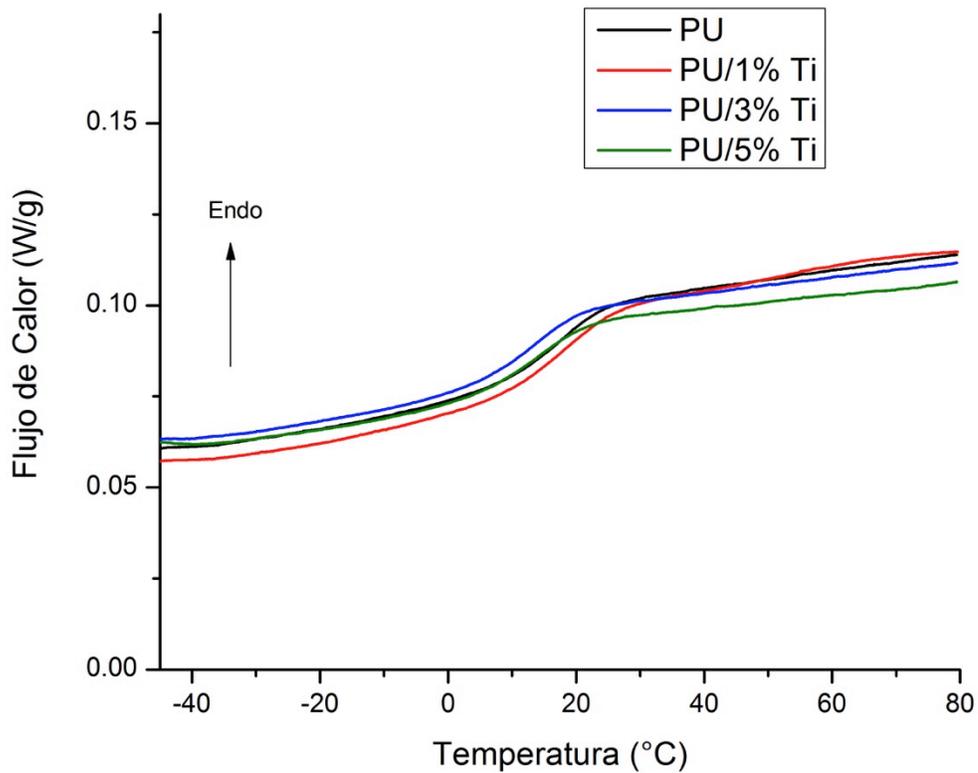


Figura 3.46. DSC de las espumas de los materiales compuestos de PU/Ti.

### 3.3.1.10. DRX

Los difractogramas de rayos X, mostrados en la figura 3.47 evidencian la presencia de titanio en los materiales compuestos, haciéndose más intenso el pico correspondiente al aumentar la cantidad de titanio presente en los materiales compuestos. El pico principal del titanio se observa a  $2\theta = 40.2^\circ$  [78], y se puede observar como un pico marcado en la

gráfica correspondiente al titanio, y ausente en la correspondiente al poliuretano puro. Este pico aumenta su intensidad al pasar de 0 a 1, 3 y 5%. Otros picos característicos de menor intensidad del titanio a  $2\theta = 35.1^\circ$  y  $38.4^\circ$  [78], presentaron un comportamiento similar. Adicionalmente, en las gráficas se puede observar una banda ancha correspondiente a la fase amorfa del poliuretano entre  $2\theta=14^\circ$  y  $25^\circ$ , que va perdiendo intensidad a medida que la concentración porcentual del poliuretano decrece en las espumas de los materiales compuestos [37].

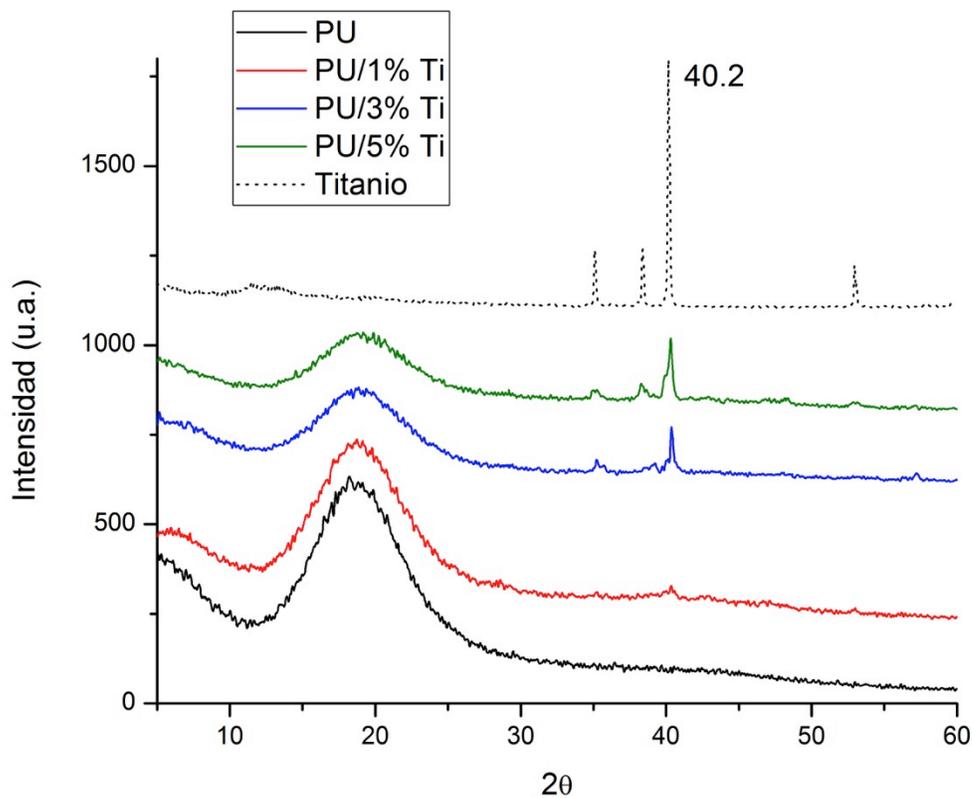


Figura 3.47. Difractograma DRX de titanio, y espumas de poliuretano y materiales compuestos de 1, 3 y 5% de titanio.

### 3.3.2. Caracterización Mecánica de las Espumas de PU/Ti

Mediante pruebas mecánicas a compresión se determinó el módulo elástico y el esfuerzo a compresión de las espumas de los materiales preparados; estas propiedades se reportan en

la tabla 3.18, y las curvas esfuerzo-deformación se presentan en la figura 3.48. Los valores obtenidos son concordantes con los valores esperados y reportados en la literatura, como los de Wang et al. (2009) que siguiendo una metodología similar obtuvo espumas de PU a base de CO y partículas de HA y reportó esfuerzos a compresión de 114 kPa para espumas con 60% (p/p) de HA, a diferencia de Li et al. (2015) quien reporta esfuerzos de compresión de 3.05 MPa y módulos elásticos de 57.5 MPa para espumas de PU a base de CO con 40% (p/p) de HA [37,45]. El efecto del titanio sobre este comportamiento sugiere un reforzamiento del material, que se incrementa al aumentar la concentración de titanio. Cabe mencionar, para la mejor comprensión de los resultados anteriormente presentados, que las espumas de los materiales compuestos de PU y Ti presentan diferentes porosidades, y que en general, las propiedades mecánicas de las espumas se relacionan a su porosidad. Otra consideración en cuanto a las propiedades mecánicas de compresión de las espumas es que las pruebas se llevaron a cabo a una temperatura de 25 °C aproximadamente, por lo que se encontraban, según el análisis DMA, a una temperatura en la cual las propiedades mecánicas se encuentran determinadas por la cercanía a la temperatura de  $T_g$  del material.

En general, las propiedades mecánicas a compresión de los materiales compuestos obtenidos en forma de espumas, fueron bajas con respecto a las del hueso esponjoso.

Tabla 3.18. Propiedades mecánicas de compresión de las espumas de PU, materiales compuestos, y de la espuma de PU con dibutil dilaurato de estaño como catalizador.

<b>Material</b>	<b>Módulo Elástico</b>	<b>Esfuerzo</b>
	kPa	kPa
PU	163.6 ± 39.8	12.9 ± 3.1
PU/1% Ti	497.3 ± 79.9	38.5 ± 10.2
PU/3% Ti	653.7 ± 107.5	69.4 ± 11.5
PU/5% Ti	845.9 ± 42.4	116.7 ± 23.9
PU-Laur	27.5 ± 4.2	2.8 ± 0.6

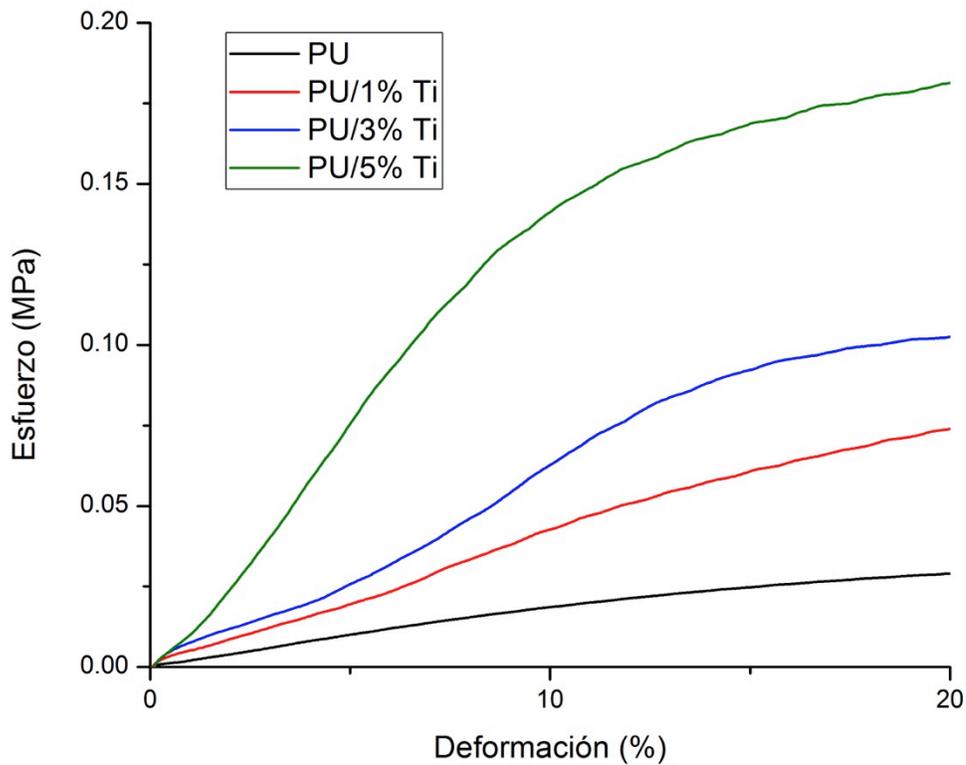


Figura 3.48. Curva esfuerzo-deformación de compresión de las espumas de PU y materiales compuestos.

Se realizó un ANOVA con prueba de Tukey, para determinar diferencias entre los grupos, para los esfuerzos máximos a compresión y módulo elástico de los materiales. Se encontró diferencias significativas ( $p = 0.000$ ) entre grupos para los esfuerzos a 10% de deformación, pero evaluado individualmente, no existe diferencias significativas entre las espumas de 1% y 3% de Ti y entre las del PU y las del 1% de Ti (ver figura 3.49); para los módulos elásticos se encontraron diferencias significativas entre grupos ( $p = 0.000$ ), pero evaluado individualmente, no existe diferencias significativas entre las espumas de 1% y 3% de Ti, como se observa en la figura 3.50.

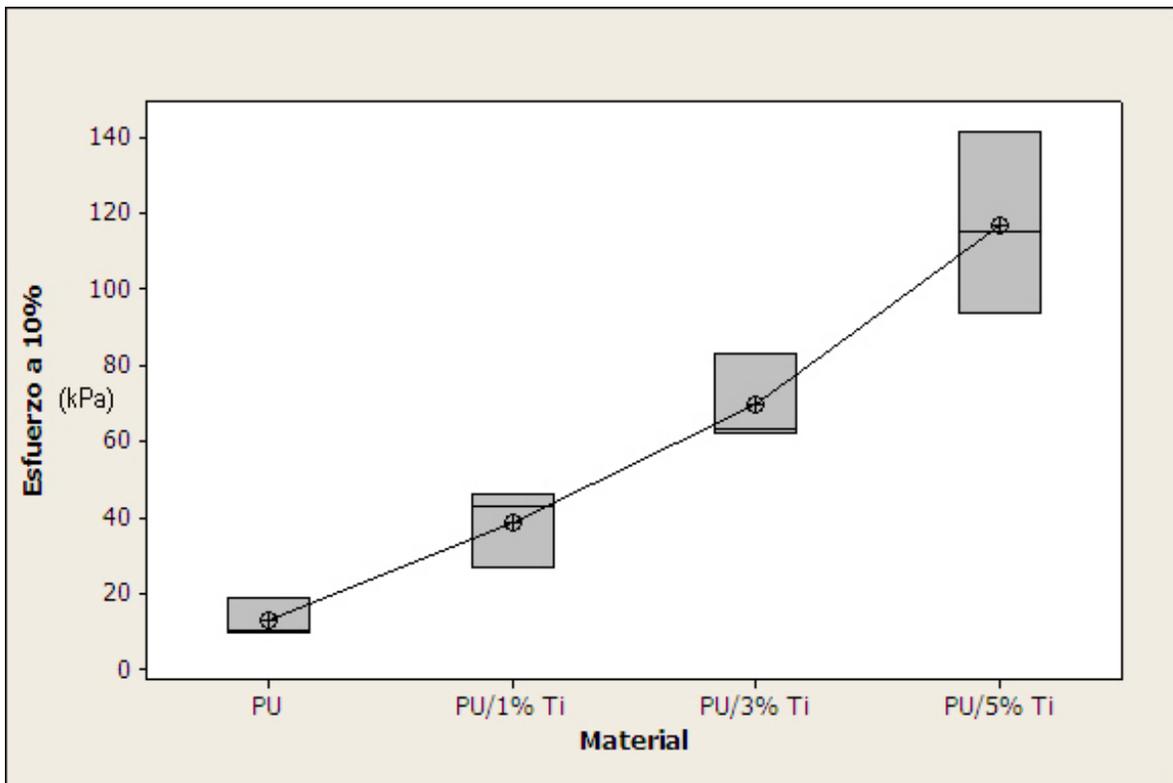


Figura 3.49. Gráfica de caja del ANOVA con prueba de Tukey del esfuerzo a 10% de deformación a compresión de las espumas.

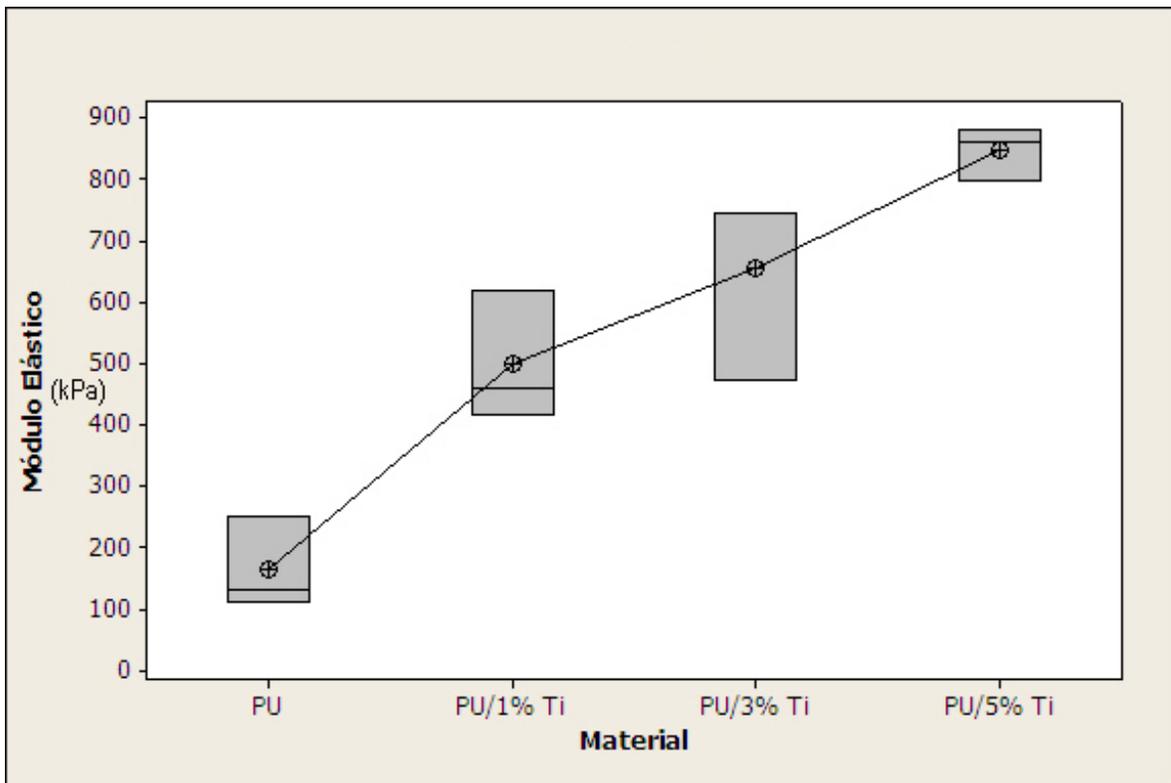


Figura 3.50. Gráfica de caja del ANOVA con prueba de Tukey del módulo elástico de compresión de las espumas.

Adicionalmente a lo anterior, se realizaron pruebas mecánicas a compresión para las espumas de PU con dibutil dilaurato de estaño como catalizador (PU-Laur), que al ser comparadas contra las propiedades de las espumas del PU puro preparado utilizando como catalizador octanoato de estaño, mostraron tener propiedades mecánicas inferiores tanto para el módulo elástico a compresión como de esfuerzo a 10% de deformación a compresión. Para el análisis de estos resultados se realizó un ANOVA con prueba de Tukey, para determinar diferencias entre los grupos. Se encontró diferencias significativas ( $p = 0.026$ ) entre las espumas de los dos grupos para los esfuerzos a 10% de deformación; para los módulos elásticos se encontraron diferencias significativas entre cada uno de los grupos de espumas de PU y PU-Laur ( $p = 0.037$ ). Por lo anterior se decidió descartar el uso de dibutil dilaurato de estaño como catalizador de la reacción de síntesis de las espumas de poliuretano.

### 3.3.3. Pruebas de Degradación *in vitro* de las Espumas de PU/Ti

Los resultados de las pruebas de degradación mostraron que las espumas de los materiales compuestos, así como la del PU puro, fueron estables en agua destilada, teniendo una pérdida de masa promedio de  $\approx 1\%$ , lo que sugiere que al menos en las condiciones estudiadas no se identifica alguna degradación hidrolítica del material [94].

Para la prueba de degradación oxidativa en el medio de  $H_2O_2$  al 30%, las espumas presentaron una degradación total, lo cual sugiere una degradación oxidativa del polioliol, en este caso aceite de ricino, con lo cual se generaría una degradación escicional por cortes de la cadena principal, con una consecuente reducción de peso molecular. Los resultados de esta prueba concuerdan con lo encontrado en la literatura, como ejemplo, Da Silva *et al.* en 2010 reportan que los poliuretanos biocompatibles pueden ser degradados por procesos oxidativos mediados por neutrófilos o macrófagos derivados de monocitos [44].

Las espumas de aceite de ricino e IPDI sintetizadas con octanoato de estaño como catalizador mostraron un comportamiento de degradación total al ser sometidas a procesos de degradación acelerada *in vitro* a  $100^\circ C$  por reflujo por 24 h en medio ácido e hidróxido, y parcialmente degradada en medio de hipoclorito de sodio al 6%. La Tabla 3.19 resume la pérdida de masa de las espumas con titanio en distintos medios de degradación.

Tabla 3.19. Degradación de los materiales en diferentes medios por reflujo a  $100^\circ C$  durante 24 h, reportadas como masa perdida (%).

Material	$H_2O_2$	HCl	NaOH	NaClO	Agua Destilada
PU	100	100	100	$45.2 \pm 3.5$	$1.41 \pm 0.38$
PU/1% Ti	100	100	100	$29.1 \pm 4.7$	$1.07 \pm 0.22$
PU/3% Ti	100	100	100	$23.1 \pm 3.3$	$0.60 \pm 0.14$
PU/5% Ti	100	100	100	$21.0 \pm 5.2$	$1.03 \pm 0.29$

Posterior a la degradación en hipoclorito de sodio, la masa recuperada fue analizada por FTIR, y se encontró que los materiales presentan picos similares a los materiales no degradado (ver figura 3.51), teniendo diferencia notoria en las intensidades de los picos, los cuales varían para cada composición no degradada. En las muestras degradadas se muestran de igual intensidad todos los picos, probablemente debido a que a efecto de la degradación

los materiales pierden superficialmente el contenido de partículas de titanio, dejando únicamente el PU, y al ser el mismo, las intensidades de los picos característicos se muestran similares. Una diferencia importante es que en las espumas degradadas aparece un hombro no registrado en las espumas sin degradar, que se ubica a  $1806\text{ cm}^{-1}$  y esta asociado al enlace C=O, probablemente se produce anhídridos posterior a la degradación, como lo describe Mohd-Rus (2009), debido a un efecto de la degradación, proviniendo del éster del polioliol, principalmente ácido ricinoléico [65].

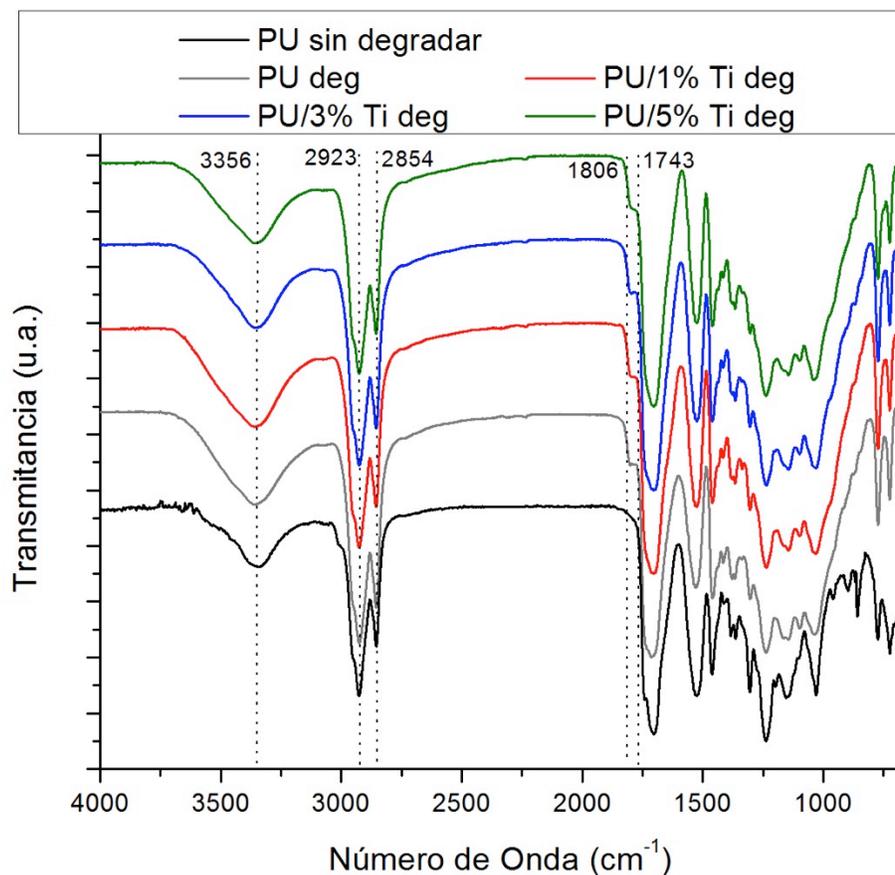


Figura 3.51. Espectrogramas FTIR de las películas posterior a la degradación (deg) en NaOCl.

### **3.3.4. Ensayos de Biocompatibilidad de las Espumas de PU/Ti**

#### *3.3.4.1. Ensayos de Viabilidad Celular*

La viabilidad celular determinada por ensayos de Alamar Blue hasta por 21 días resultó mayor al 70% con respecto a los controles celulares positivos (ver figura 3.52). Los mayores niveles de viabilidad celular fueron presentados a los 7 días para todos los materiales evaluados, a excepción del material PU/5% Ti que presentó niveles similares a los 7 y 14 días. Dependiendo del contenido de titanio en la espuma, los materiales presentaron valores por encima de 95% de viabilidad celular excepto el material de 5% de Ti, donde la viabilidad fue de 85%. Los valores para los días 14 y 21 resultaron menores que los del día 7 pero se mantuvieron estables entre el 80 y 90% para los 14 días y entre 75 y 80% para los 21. Para los tiempos de 14 y 21 días no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los valores de viabilidad celular para cada material. Todas las espumas, mostraron una aceptable biocompatibilidad del material para las CTPDH.

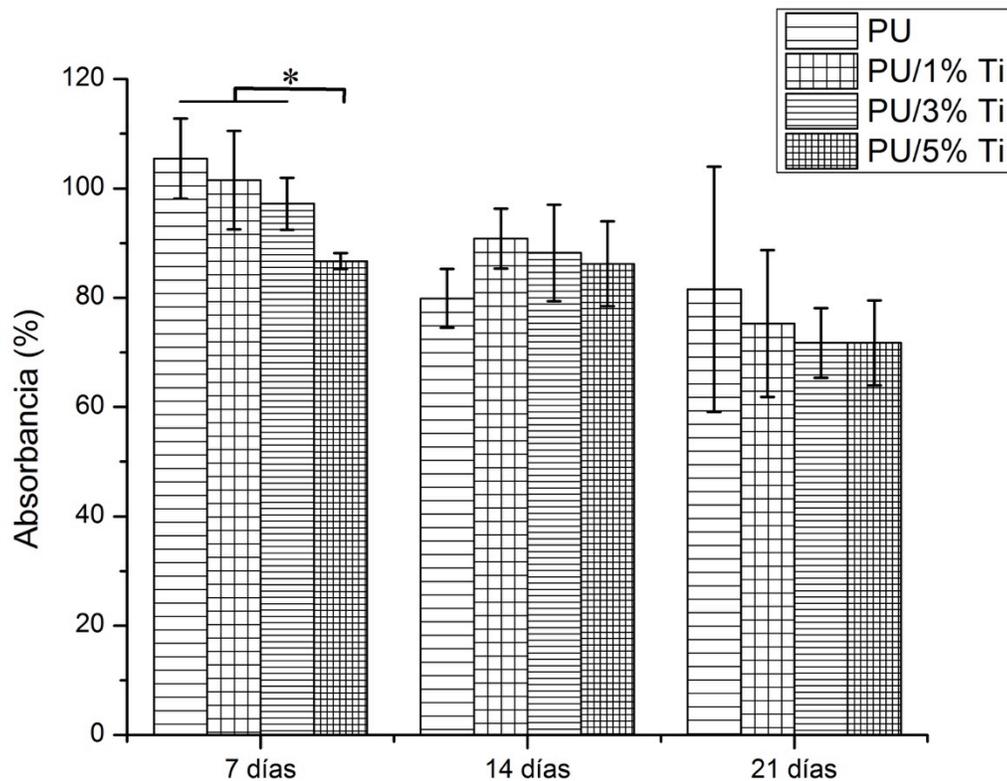


Figura 3.52. Ensayos de viabilidad celular por Alamar Blue sobre las espumas de los materiales compuestos. \*Indica diferencia significativa entre grupos ( $p \leq 0.05$ ).

#### 3.3.4.2. Ensayos de Proliferación Celular

Los ensayos de proliferación celular con CTPDH para las espumas de los materiales compuestos de PU y Ti, y para el PU puro, mostraron una buena proliferación celular a 7 días con valores entre 120 y 150% con respecto a los controles celulares positivos; sin embargo, los valores de proliferación celular cayeron a niveles del 60% a los 14 días, y se mantuvieron hasta los 21 días de incubación, como se muestra en la figura 3.53. A pesar que los valores de los estándares para biocompatibilidad son del 70%, no se descarta la biocompatibilidad de los materiales estudiados al considerar el error estándar de las medias de absorbancia para cada material. A excepción del material compuesto de PU/1% Ti a 14 días con que tuvo mayor proliferación celular con respecto a los otros materiales, a ningún tiempo estudiado hubo diferencias estadísticamente significativas en los valores de

proliferación celular para cada material, por lo que se sugiere que el titanio no representa alguna mejoría en las propiedades de biocompatibilidad de las espumas de los materiales compuestos. Una posible explicación para la mayor proliferación celular del material PU/1% Ti a 14 días es que pudiera haber una mejoría de la biocompatibilidad asociada al Ti, y que la morfología de la espuma favorezca que las células permanezcan adheridas a la estructura, en comparación con PU/3% Ti y PU/5% Ti, las cuales presentan una estructura con celdas menos uniformes y más irregulares; lo anterior, llevaría a cuestionar la conclusión previa, respecto a la mejoría de la biocompatibilidad conferida por el Ti a los materiales compuestos, ya que, es posible que el titanio si mejore la biocompatibilidad de los materiales, pero a su vez, cause un efecto no favorable para la proliferación celular, al crear celdas de forma irregular y con mayor cantidad de poros, como se observan en imágenes MEB.

El comportamiento de biocompatibilidad celular para CTPDH de este estudio es coincidente con otros, reportados en la literatura, sobre materiales similares de PU [11,37], así como con estructuras de titanio [84,85].

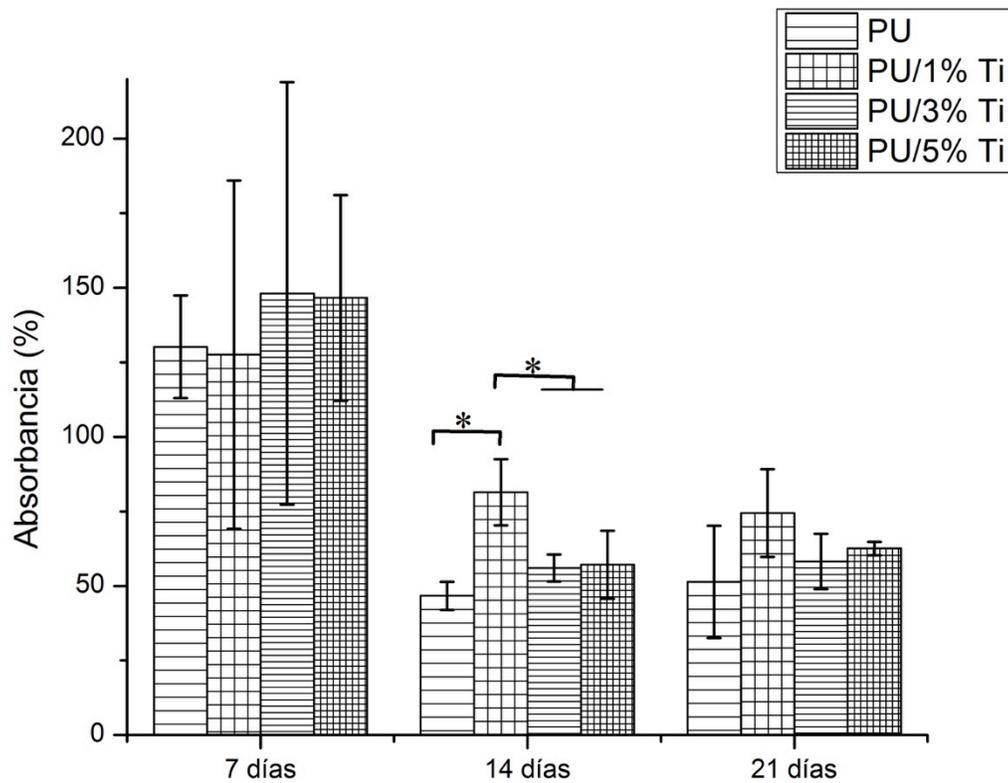


Figura 3.53. Ensayos de proliferación celular por MTT sobre espumas de los materiales compuestos. \*Indica diferencia significativa entre grupos ( $p \leq 0.05$ ).

## CONCLUSIONES

La caracterización de las partículas de titanio mediante FTIR, Raman, EDX, XPS y DRX mostró que están compuestas de titanio con una capa superficial de óxido de titanio. Poliuretanos sintetizados con PCL, HMDI y Glutamina se usaron como matrices para la fabricación de materiales compuestos en forma de película utilizando 1, 3 y 5% p/p de titanio. Estas películas presentaron una dispersión homogénea de las partículas de titanio, con algunas aglomeraciones a medida que dicha concentración aumentó. La temperatura de descomposición y la  $T_g$  de los materiales compuestos en forma de película no variaron con la incorporación de las partículas de titanio. De igual modo, ni la temperatura de fusión ni la entalpía de fusión de la porción cristalina del polímero varió con la inclusión de partículas de titanio y por lo tanto se mantuvo el porcentaje de cristalinidad. La DRX corroboró la existencia de una matriz semicristalina, proveniente del la PCL, y la presencia de estructuras cristalinas provenientes de titanio, cuyos picos aumentaron de intensidad con el aumento de la cantidad de titanio en la películas. Nuevamente, los porcentajes de cristalinidad de los materiales no variaron significativamente con la inclusión de titanio. El SAXS mostró distancias interlamelares más amplias para el poliuretano puro, mismas que se reducen con la incorporación de titanio. Las propiedades mecánicas de tensión no evidenciaron algún efecto de reforzamiento del titanio en la matriz de SPU-G. Sin embargo, a bajas tasa de deformación (50 mm/min) su deformación máxima disminuyó significativamente al aumentar la concentración de partículas de Ti. Las películas de SPU-G/Ti mostraron un marcada hidrofobicidad, conferida por la matriz polimérica de poliuretano a base de PCL. Sin embargo, mostraron biocompatibilidad con células troncales de pulpa dental humana, y osteoblastos de ratón, tanto en pruebas de viabilidad celular como de proliferación celular. Aunado a este buen desempeño en términos de citotoxicidad, estos materiales compuestos resultaron completamente degradables en condiciones aceleradas en medios oxidativos, ácidos y alcalinos.

Espumas de poliuretano a base de aceite de ricino, IPDI y butanodiol con buenas propiedades fisicoquímicas y mecánicas fueron obtenidas cuando se empleó octanoato de estaño como catalizador y agua como agente espumante. Con esta matriz también se obtuvieron materiales compuestos conteniendo 1, 3 y 5% p/p de titanio incorporado durante la polimerización. La presencia de partículas de Ti resultó evidente por el cambio de coloración en las espumas, haciéndose más oscuro a mayor cantidad de titanio presente. El FTIR no evidenció la presencia del Ti aunque la espectroscopía Raman mostró absorciones asociadas a dicho elemento, las cuales aumentaron de intensidad con la concentración de titanio. Adicionalmente, la presencia de partículas de Ti en los materiales compuestos fue confirmada por DRX. La densidad de los materiales compuestos se incrementó al aumentar la concentración de partículas mientras que porosidad de las espumas, disminuyó al aumentar su concentración. Mediante MEB se observaron poros aparentemente interconectados. El mapeo de titanio mediante MEB-EDX demostró una dispersión homogénea de las partículas con zonas ricas en este metal a medida que la concentración aumentaba. Las temperaturas de descomposición de las espumas con titanio tampoco fueron afectadas por la inclusión de partículas de Ti. Las masas residuales posteriores a la degradación térmica por TGA de los materiales compuestos coinciden con su composición porcentual (P/P) inicial de Ti. Las propiedades mecánicas de compresión de las espumas fueron inferiores a la del hueso esponjoso. Sin embargo, el esfuerzo a compresión y el módulo elástico de las espumas de los materiales aumentó significativamente, al incrementar la concentración de titanio. Adicionalmente, estas propiedades tienden a reducirse a partir de 20°C ya que a esta temperatura se encuentra cercana su  $T_g$ , la cual fue determinada mediante DSC o DMA; dicha temperatura se encontró alrededor de los 40°C, sin variaciones significativas por la inclusión de partículas de Ti. Las espumas de los materiales obtenidos no mostraron tener alguna transición térmica de baja temperatura asociada a fusión o cristalización, lo cual sugiere que el PU sintetizado no presenta arreglos cristalinos, y las partículas de titanio no tienen un efecto nucleante. Las espumas de los materiales resultaron completamente degradables en condiciones aceleradas en peróxido de hidrógeno, ácido clorhídrico y en hidróxido de sodio, y parcialmente degradables en el hipoclorito de sodio mientras que en agua destilada fueron estables.

Las espumas de los materiales compuestos de PU/Ti mostraron ser biocompatibles con células troncales de pulpa dental adulta humana tanto en viabilidad, como en proliferación celular. La viabilidad de CTPDH en todos los materiales fue mayor al 80% hasta los 14 días de incubación, mientras que la proliferación celular cayó hasta 60% a los 21 días.

En general, los resultados de las pruebas realizadas tanto a películas como a espumas de PU y Ti, sugieren que estos materiales compuestos pueden usarse en la regeneración ósea. Los materiales en forma de película presentaron propiedades adecuadas para ser usados como membranas para regeneración ósea o como barreras de contención para materiales de relleno de defectos óseos. Los materiales compuestos en forma de espumas podrían ser utilizados como soportes para regeneración de defectos óseos, en sitios donde las cargas mecánicas no sean excesivas, como por ejemplo en el relleno de defectos óseos después de la remoción de un osteosarcoma. Por lo anterior, se concluye que la hipótesis fue verificada, tanto para los materiales compuestos en forma de películas como para las espumas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. 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., *Int. J. Nanomedicine* 6, 93–100, 2011.
2. A. S. Brydone; D. Meek; S. Maclaine, Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering, *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.* 224(12), 1329–1343, 2010.
3. A. A. Jahangir; R. M. Nunley; S. Mehta; A. Sharan, Bone-graft substitutes in orthopaedic surgery, *AAOS Now* 2008(Jan), 5–9, 2008.
4. G. C. Gurtner; M. J. Callaghan; M. T. Longaker, Progress and potential for regenerative medicine., *Annu. Rev. Med.* 58, 299–312, 2007.
5. L. E. Niklason; R. S. Langer, Advances in tissue engineering of blood vessels and other tissues., *Transpl. Immunol.* 5(4), 303–6, 1997.
6. K. Alvarez; H. Nakajima, Metallic Scaffolds for Bone Regeneration, *Materials (Basel)*. 2(3), 790–832, 2009.
7. X. Liu; P. X. Ma, Polymeric scaffolds for bone tissue engineering., *Ann. Biomed. Eng.* 32(3), 477–86, 2004.
8. J. R. Jones, Scaffolds for tissue engineering, In: *Biomaterials, artificial organs and tissue engineering*, 2005, pp. 201–214.
9. J. L. Ryszkowska; M. Auguścik; A. Sheikh; A. R. Boccaccini, Biodegradable polyurethane composite scaffolds containing Bioglass® for bone tissue engineering, *Compos. Sci. Technol.* 70(13), 1894–1908, 2010.
10. M. Bil; J. Ryszkowska; P. Woźniak; K. J. Kurzydłowski; *et al.*, Optimization of the

- structure of polyurethanes for bone tissue engineering applications., *Acta Biomater.* 6(7), 2501–10, 2010.
11. F. J. Aguilar-Pérez; R. F. Vargas-Coronado; J. M. Cervantes-Uc; J. V. Cauch-Rodríguez; *et al.*, Preparation and bioactive properties of nano bioactive glass and segmented polyurethane composites., *J. Biomater. Appl.* 30(9), 1362–72, 2016.
  12. V. Demétrio da Silva; L. M. dos Santos; S. M. Subda; R. Ligabue; *et al.*, Synthesis and characterization of polyurethane/titanium dioxide nanocomposites obtained by in situ polymerization, *Polym. Bull.* 70(6), 1819–1833, 2013.
  13. J. H. E. Cartwright; A. G. Checa; C. I. Sainz-Díaz, The present scope of Biomineralization, *J. Struct. Biol.* 196(2), 65–66, 2016.
  14. N. K. Lee; H. Sowa; E. Hinoi; M. Ferron; *et al.*, Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton., *Cell* 130(3), 456–69, 2007.
  15. E. Jimi; S. Hirata; K. Osawa; M. Terashita; *et al.*, The current and future therapies of bone regeneration to repair bone defects., *Int. J. Dent.* 2012, 148261, 2012.
  16. T. Katagiri; N. Takahashi, Bone Biology Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation, (March), 147–159, 2002.
  17. M. Navarro; J. A. Planell, Bioactive Composites Based on Calcium Phosphates for Bone Regeneration, *Key Eng. Mater.* 441, 203–233, 2010.
  18. Y. C. Chai; A. Carlier; J. Bolander; S. J. Roberts; *et al.*, Current views on calcium phosphate osteogenicity and the translation into effective bone regeneration strategies, *Acta Biomater.* 8(11), 3876–3887, 2012.
  19. D. Hatch, Bone Grafting, <http://www.orthobullets.com/basic-science/9011/bone-grafting>, 2014.
  20. D. Smrke; P. Rožman; M. Veselko; B. Gubina, Treatment of Bone Defects—Allogenic Platelet Gel and Autologous Bone Technique, , 2013.

21. J. E. Mumford; A. H. R. W. Simpson, MANAGEMENT OF BONE DEFECTS A Review of Available Techniques, *Iowa Orthop. J.* 12, 42–9, 1992.
22. A. Oryan; S. Alidadi; A. Moshiri, Current concerns regarding healing of bone defects, *Hard Tissue* , 1–12, 2013.
23. B. P. Cagigal; L. M. R. González; A. V. Hernández; A. S. Soto; *et al.*, Estudio experimental sobre la regeneración ósea mandibular de la rata con diferentes biomateriales Experimental study in rats of mandibular bone regeneration with different biomaterials, 5, 313–323, 2008.
24. J. R. Jones; P. D. Lee, Bioactive Glass Scaffolds with Hierarchical Structure and their 3D Characterization, *Key Eng. Mater.* 441, 123–137, 2010.
25. U. Deisinger, Generating Porous Ceramic Scaffolds: Processing and Properties, *Key Eng. Mater.* 441, 155–179, 2010.
26. H. Liu; L. Zhang; J. Li; Q. Zou; *et al.*, Physicochemical and biological properties of nano-hydroxyapatite-reinforced aliphatic polyurethanes membranes., *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 21(12), 1619–36, 2010.
27. F. Ku Carrillo; M. Aguilar Saavedra; M. Yudovich Burak; F. Ortiz Monasterio; *et al.*, Determinación de las diferencias entre las proporciones de los tejidos óseos con cefalometrías , y de los tejidos blandos con fotografías frontales en pacientes con microsomía hemifacial sometidos a distracción ósea maxilomandibular simultánea, *Rev. Odontológica Mex.* 11(2), 63–69, 2007.
28. D. Abbasi, Platelet-Rich Plasma, , 2013. Available at <<http://www.orthobullets.com/basic-science/9090/platelet-rich-plasma>>
29. L. Moreno Reyes; G. Marín González; F. Enríquez Habib, Utilización de plasma rico en plaquetas para regeneración periodontal en un perro, *Rev. Odontológica Mex.* 8(3), 64–69, 2004.
30. M. Geiger; R. Li; W. Friess, Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2,

*Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(12), 1613–1629, 2003.

31. A. W. James; G. LaChaud; J. Shen; G. Asatrian; *et al.*, A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2, *Tissue Eng. Part B Rev.* 22(4), 284–297, 2016.
32. A. Gil Pilonieta; J. Franklin; L. J. Cruz Riaño, Poliuretanos degradables a partir de aceite de higuera., *Sci. Tech.* XIII(36), 1–6, 2007.
33. M. Bil; J. Ryszkowska; K. J. Kurzydłowski, Effect of polyurethane composition and the fabrication process on scaffold properties, *J. Mater. Sci.* 44(6), 1469–1476, 2008.
34. S. Guelcher; K. M. Gallagher; J. E. Didier; D. B. Klinedinst; *et al.*, Synthesis of biocompatible segmented polyurethanes from aliphatic diisocyanates and diurea diol chain extenders., *Acta Biomater.* 1(4), 471–84, 2005.
35. J. E. Salvatore; M. P. Mandarino, Polyurethane polymer, its use in osseous lesions: an experimental study., *Ann. Surg.* 149(1), 107–9, 1959.
36. K. L. Calvert; K. P. Trumble; T. J. Webster; L. a Kirkpatrick, Characterization of commercial rigid polyurethane foams used as bone analogs for implant testing., *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21(5), 1453–61, 2010.
37. L. Wang; Y. Li; Y. Zuo; L. Zhang; *et al.*, Porous bioactive scaffold of aliphatic polyurethane and hydroxyapatite for tissue regeneration, *Biomed. Mater.* 4(2), 25003, 2009.
38. S. Gogolewski; K. Gorna; E. Zaczynska; A. Czarny, Structure-property relations and cytotoxicity of isosorbide-based biodegradable polyurethane scaffolds for tissue repair and regeneration., *J. Biomed. Mater. Res. A* 85(2), 456–65, 2008.
39. H. Yeganeh; P. Hojati-Talemi, Preparation and properties of novel biodegradable polyurethane networks based on castor oil and poly(ethylene glycol), *Polym. Degrad. Stab.* 92(3), 480–489, 2007.

40. L. A. Matheson; J. P. Santerre; R. S. Labow, Changes in Macrophage Function and Morphology due to Biomedical Polyurethane Surfaces Undergoing Biodegradation, *J. Cell. Physiol.* 199(1), 8–19, 2004.
41. J. M. Cangemi; A. M. dos Santos; S. C. Neto; G. O. Chierice, Biodegradation of polyurethane derived from castor oil, *Polímeros* 18(3), 201–206, 2008.
42. S. A. Guelcher, Biodegradable polyurethanes: synthesis and applications in regenerative medicine., *Tissue Eng. Part B. Rev.* 14(1), 3–17, 2008.
43. S. K. Phua; E. Castillo; J. M. Anderson; A. Hiltner, Biodegradation of a polyurethane in vitro., *J. Biomed. Mater. Res.* 21(2), 231–246, 1987.
44. G. R. Da Silva; A. Da Silva-Cunha; F. Behar-Cohen; E. Ayres; *et al.*, Biodegradation of polyurethanes and nanocomposites to non-cytotoxic degradation products, *Polym. Degrad. Stab.* 95(4), 491–499, 2010.
45. L. Li; Y. Zuo; Q. Zou; B. Yang; *et al.*, Hierarchical Structure and Mechanical Improvement of an n-HA/GCO–PU Composite Scaffold for Bone Regeneration, *ACS Appl. Mater. Interfaces* , 151002103911000, 2015.
46. R. S. Nacer; R. R. Poppi; P. D. T. C. de Carvalho; B. A. K. da Silva; *et al.*, Spii\_sup poliuretana de mamona contendo nanopartículas de sílica como material de preenchimento de defeito ósseo em ratos, *Acta Cir. Bras.* 27(1), 2012–2061, 2012.
47. W. R. Saran; G. O. Chierice; R. A. B. da Silva; A. M. de Queiroz; *et al.*, Castor oil polymer induces bone formation with high matrix metalloproteinase-2 expression., *J. Biomed. Mater. Res. A* 102(2), 324–31, 2014.
48. A. A. R. de Oliveira; S. M. de Carvalho; M. D. F. Leite; R. L. Oréfice; *et al.*, Development of biodegradable polyurethane and bioactive glass nanoparticles scaffolds for bone tissue engineering applications, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 100(5), 1387–96, 2012.
49. R. Singh; P. D. Lee; J. R. Jones; G. Poologasundarampillai; *et al.*, Hierarchically

- structured titanium foams for tissue scaffold applications., *Acta Biomater.* 6(12), 4596–604, 2010.
50. Y. Torres; J. J. Pavón; I. Nieto; J. a. Rodríguez, Conventional Powder Metallurgy Process and Characterization of Porous Titanium for Biomedical Applications, *Metall. Mater. Trans. B* 42(4), 891–900, 2011.
  51. Z. Shi; K. G. Neoh; E. T. Kang; C. K. Poh; *et al.*, Surface functionalization of titanium with carboxymethyl chitosan and immobilized bone morphogenetic protein-2 for enhanced osseointegration., *Biomacromolecules* 10(6), 1603–11, 2009.
  52. Y. Torres; J. J. Pavón; J. a. Rodríguez, Processing and characterization of porous titanium for implants by using NaCl as space holder, *J. Mater. Process. Technol.* 212(5), 1061–1069, 2012.
  53. R. A. Pareta; A. B. Reising; T. Miller; D. Storey; *et al.*, An understanding of enhanced osteoblast adhesion on various nanostructured polymeric and metallic materials prepared by ionic plasma deposition., *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 92(3), 1190–201, 2010.
  54. Y. Torres; J. a. Rodríguez; S. Arias; M. Echeverry; *et al.*, Processing, characterization and biological testing of porous titanium obtained by space-holder technique, *J. Mater. Sci.* 47(18), 6565–6576, 2012.
  55. E. D. Spoerke; N. G. Murray; H. Li; L. C. Brinson; *et al.*, A bioactive titanium foam scaffold for bone repair., *Acta Biomater.* 1(5), 523–33, 2005.
  56. M. a Lopez-Heredia; J. Sohier; C. Gaillard; S. Quillard; *et al.*, Rapid prototyped porous titanium coated with calcium phosphate as a scaffold for bone tissue engineering., *Biomaterials* 29(17), 2608–15, 2008.
  57. S. Solorzano; V. Balsamo; A. Müller, ESTUDIO DE LA BIODEGRADABILIDAD DE MEZCLAS PCL/ALMIDÓN DE YUCA CON LECITINA Y DIÓXIDO DE TITANIO, *Supl. la Rev. Latinoam. Metal. y Mater.* 2(1), 157–158, 2009.

58. C. Wu, In situ polymerization of titanium isopropoxide in polycaprolactone: Properties and characterization of the hybrid nanocomposites, *J. Appl. Polym. Sci.* 92, 1749–57, 2004.
59. H. Sakamoto; H. Dio; E. Kobayashi; T. Yoneyama; *et al.*, Structure and strength at the bonding interface of a titanium-segmented polyurethane composite through 3-(trimethoxysilyl) propyl methacrylate for artificial organs, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 82(1), 52–61, 2007.
60. R. De Santis; M. Catauro; L. Di Silvio; L. Manto; *et al.*, Effects of polymer amount and processing conditions on the in vitro behaviour of hybrid titanium dioxide/polycaprolactone composites., *Biomaterials* 28(18), 2801–9, 2007.
61. T. Wang; H. Jiang; L. Wan; Q. Zhao; *et al.*, Potential application of functional porous TiO<sub>2</sub> nanoparticles in light-controlled drug release and targeted drug delivery., *Acta Biomater.* 13, 354–63, 2015.
62. J. Chen; Y. Zhou; Q. Nan; Y. Sun; *et al.*, Synthesis, characterization and infrared emissivity study of polyurethane/TiO<sub>2</sub> nanocomposites, *Appl. Surf. Sci.* 253(23), 9154–9158, 2007.
63. X.-C. Che; Y.-Z. Jin; Y.-S. Lee, Preparation of nano-TiO<sub>2</sub>/polyurethane emulsions via in situ RAFT polymerization, *Prog. Org. Coatings* 69(4), 534–538, 2010.
64. P. Liu; H. Liu; G. Liu; K. Yao; *et al.*, Preparation of TiO<sub>2</sub> nanotubes coated on polyurethane and study of their photocatalytic activity, *Appl. Surf. Sci.* 258(24), 9593–9598, 2012.
65. A. Z. Mohd-Rus; T. J. Kemp; A. J. Clark, Degradation studies of polyurethanes based on vegetable oils. Part 2. thermal degradation and materials properties, *Prog. React. Kinet. Mech.* 34, 1–41, 2009.
66. J. Hieda; M. Niinomi; M. Nakai; H. Kamura; *et al.*, Effect of terminal functional groups of silane layers on adhesive strength between biomedical Ti-29Nb-13Ta-

- 4.6Zr alloy and segment polyurethanes, *Surf. Coatings Technol.* 206(13), 3137–3141, 2012.
67. N. Adden; L. J. Gamble; D. G. Castner; A. Hoffmann; *et al.*, Synthesis and characterization of biocompatible polymer interlayers on titanium implant materials., *Biomacromolecules* 7(9), 2552–9, 2006.
68. N. Adden; L. Gamble; D. Castner, Phosphonic acid monolayers for binding of bioactive molecules to titanium surfaces, *Langmuir* (19), 8197–8204, 2006.
69. V. Zoulalian; S. Zürcher; S. Tosatti; M. Textor; *et al.*, Self-assembly of poly(ethylene glycol)-poly(alkyl phosphonate) terpolymers on titanium oxide surfaces: synthesis, interface characterization, investigation of nonfouling properties, and long-term stability., *Langmuir ACS J. surfaces colloids* 26(1), 74–82, 2010.
70. V. Zoulalian; S. Monge; S. Zürcher, Functionalization of titanium oxide surfaces by means of poly (alkyl-phosphonates), *J. Phys. Chemistry B* 110(51), 25603–25605, 2006.
71. G. Guerrero; P. Mutin; A. Vioux, Anchoring of phosphonate and phosphinate coupling molecules on titania particles, *Chem. Mater.* (19), 4367–4373, 2001.
72. H. P. Felgueiras; A. Decambron; M. Manassero; L. Tulasne; *et al.*, Bone tissue response induced by bioactive polymer functionalized Ti6Al4V surfaces: In vitro and in vivo study, *J. Colloid Interface Sci.* 491, 44–54, 2017.
73. P. Rocas; M. Hoyos-Nogués; J. Rocas; J. M. Manero; *et al.*, Installing Multifunctionality on Titanium with RGD-Decorated Polyurethane-Polyurea Roxithromycin Loaded Nanoparticles: Toward New Osseointegrative Therapies, *Adv. Healthc. Mater.* 4(13), 1956–1960, 2015.
74. X. Liu; P. K. Chu; C. Ding, Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. R Reports* 47(3–4), 49–121, 2004.

75. X. Zhang; H. Su; Y. Zhao; T. Tan, Antimicrobial activities of hydrophilic polyurethane/titanium dioxide complex film under visible light irradiation, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 199(2–3), 123–129, 2008.
76. S. G. Steinemann, Titanium — the material of choice?, *Periodontol.* 2000 17(1), 7–21, 1998.
77. L. Jonasova; F. A. Muller; A. Helebrant; J. Strnad; *et al.*, Biomimetic apatite formation on chemically treated titanium, *Biomaterials* 25, 1187–1194, 2004.
78. X. X. Wang; W. Yan; S. Hayakawa; K. Tsuru; *et al.*, Apatite deposition on thermally and anodically oxidized titanium surfaces in a simulated body fluid, *Biomaterials* 24(25), 4631–4637, 2003.
79. D. M. Brunette; P. Tengvall; M. Textor; P. Thomsen, Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications, Springer Berlin Heidelberg, 2012.
80. H. Schliephake; A. Aref; D. Scharnweber; S. Bierbaum; *et al.*, Effect of immobilized bone morphogenic protein 2 coating of titanium implants on peri-implant bone formation, *Clin. Oral Implants Res.* 16(5), 563–9, 2005.
81. L. S. Barbarash; E. N. Bolbasov; L. V Antonova; V. G. Matveeva; *et al.*, Surface modification of poly-E-caprolactone electrospun fibrous scaffolds using plasma discharge with sputter deposition of a titanium target, *Mater. Lett.* 171, 87–90, 2016.
82. C. Covarrubias; F. Arroyo; C. Balanda; I. Celhay; *et al.*, In vitro bioactivity and cell differentiation properties of nanobioceramics with different nanostructure, , 2014.
83. E. Katsanevakis; X. J. Wen; D. L. Shi; N. Zhang, Biomineralization of Polymer Scaffolds, *Key Eng. Mater.* 441, 269–295, 2010.
84. C. Mangano; A. De Rosa; V. Desiderio; R. D’Aquino; *et al.*, The osteoblastic differentiation of dental pulp stem cells and bone formation on different titanium

- surface textures, *Biomaterials* 31(13), 3543–3551, 2010.
85. W. Zhang; X. Frank Walboomers; T. H. van Kuppevelt; W. F. Daamen; *et al.*, The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials, *Biomaterials* 27(33), 5658–5668, 2006.
  86. C. Covarrubias; F. Arroyo; C. Balanda; M. Neira; *et al.*, The Effect of the Nanoscale Structure of Nanobioceramics on Their In Vitro Bioactivity and Cell Differentiation Properties, *J. Nanomater.* 2015(ID 526030), 1–14, 2015.
  87. S. Jiang; X. Ji; L. An; B. Jiang, Crystallization behavior of PCL in hybrid con ® ned environment, *Polymer (Guildf)*. 42(8), 3901–3907, 2001.
  88. S. Gronthos; J. Brahim; W. Li; L. W. Fisher; *et al.*, Stem cell properties of human dental pulp stem cells, *J. Dent. Res.* 81(8), 531–535, 2002.
  89. T. Ivanova; A. Harizanova, Characterization of TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>-MnO oxides prepared by sol-gel method, *Solid State Ionics* 138(3–4), 227–232, 2001.
  90. R. Avolio; M. D’Albore; V. Guarino; G. Gentile; *et al.*, Pure titanium particle loaded nanocomposites: study on the polymer/filler interface and hMSC biocompatibility, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 27(10), 2016.
  91. C. M. Smith; D. Ph; T. D. Roy; A. Bhalkikar; *et al.*, Engineering a Titanium and Polycaprolactone Construct for a Biocompatible Interface Between the Body and Artificial Limb, 16(2), 2010.
  92. C.-C. Lin; H.-C. Cheng; C.-F. Huang; C.-T. Lin; *et al.*, Enhancement of Biocompatibility on Bioactive Titanium Surface by Low-Temperature Plasma Treatment, *Jpn. J. Appl. Phys.* 44(12), 8590–8598, 2005.
  93. J. M. Cervantes-Uc; J. I. Moo-Espinosa; J. V Cauich-Rodríguez; A. Ávila-Ortega; *et al.*, TGA/FTIR studies of segmented aliphatic polyurethanes and their nanocomposites prepared with commercial montmorillonites, *Polym. Degrad. Stab.* 94(10), 1666–1677, 2009.

94. L. H. Chan-Chan; R. Solis-Correa; R. F. Vargas-Coronado; J. M. Cervantes-Uc; *et al.*, Degradation studies on segmented polyurethanes prepared with HMDI, PCL and different chain extenders, *Acta Biomater.* 6(6), 2035–2044, 2010.
95. S. M. Cetina-Diaz; L. H. Chan-Chan; R. F. Vargas-Coronado; J. M. Cervantes-Uc; *et al.*, Physicochemical characterization of segmented polyurethanes prepared with glutamine or ascorbic acid as chain extenders and their hydroxyapatite composites, *J. Mater. Chem. B* 2(14), 1966–76, 2014.
96. S. G. Musselman; T. M. Santosusso; J. D. Barnes; L. H. Sperling, Domain structure and interphase dimensions in poly(urethaneurea) elastomers using DSC and SAXS, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 37(18), 2586–2600, 1999.
97. R. M. do Nascimento; V. R. de Carvalho; J. S. Govone; A. C. Hernandez; *et al.*, Effects of negatively and positively charged Ti metal surfaces on ceramic coating adhesion and cell response, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 28(2), 2017.
98. Q. Grimal; S. Hauptert; D. Mitton; L. Vastel; *et al.*, Assessment of cortical bone elasticity and strength: Mechanical testing and ultrasound provide complementary data, *Med. Eng. Phys.* 31(9), 1140–1147, 2009.
99. A. G. B. Castro; M. Diba; M. Kersten; J. A. Jansen; *et al.*, Development of a PCL-silica nanoparticles composite membrane for Guided Bone Regeneration, *Mater. Sci. Eng. C* 85(December 2017), 154–161, 2018.
100. E. Ortolani; F. Quadrini; D. Bellisario; L. Santo; *et al.*, Mechanical qualification of collagen membranes used in dentistry, *Ann Ist Super Sanità* 51(3), 229–235, 2015.
101. G. Zapata Catzín; J. V Cauich-Rodríguez; H. Vazquez, Síntesis y caracterización de poliuretanos con atorvastatina para sistemas de liberación, , 2017.
102. L. H. Chan-Chan; C. Tkaczyk; R. F. Vargas-Coronado; J. M. Cervantes-Uc; *et al.*, Characterization and biocompatibility studies of new degradable poly(urea)urethanes prepared with arginine, glycine or aspartic acid as chain extenders, *J. Mater. Sci.*

- Mater. Med.* 24(7), 1733–1744, 2013.
103. X. Shen; P. Ma; Y. Hu; G. Xu; *et al.*, Mesenchymal stem cell growth behavior on micro/nano hierarchical surfaces of titanium substrates, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 127, 221–232, 2015.
  104. U. Hempel; T. Hefti; P. Dieter; F. Schlottig, Response of human bone marrow stromal cells, MG-63, and SaOS-2 to titanium-based dental implant surfaces with different topography and surface energy, *Clin. Oral Implants Res.* 24(2), 174–182, 2013.
  105. K. Cai; M. Frant; J. Bossert; G. Hildebrand; *et al.*, Surface functionalized titanium thin films: Zeta-potential, protein adsorption and cell proliferation, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 50(1), 1–8, 2006.
  106. S. Amin Yavari; J. van der Stok; Y. C. Chai; R. Wauthle; *et al.*, Bone regeneration performance of surface-treated porous titanium, *Biomaterials* 35(24), 6172–6181, 2014.
  107. C. Palumbo; A. Baldini; F. Cavani; P. Sena; *et al.*, Immunocytochemical and structural comparative study of committed versus multipotent stem cells cultured with different biomaterials, *Micron* 47(7), 1–9, 2013.
  108. Z. Dong; Y. Li; Q. Zou, Degradation and biocompatibility of porous nano-hydroxyapatite/polyurethane composite scaffold for bone tissue engineering, *Appl. Surf. Sci.* 255(12), 6087–6091, 2009.
  109. P. Lopes; M. Garcia; M. Fernandes; M. Fernandes, Properties and osteoblast cytocompatibility of self-curing acrylic cements modified by glass fillers., *J. Biomater. Appl.* 28(4), 498–513, 2013.
  110. M. Comí; G. Lligadas; J. C. Ronda; M. Galià; *et al.*, Synthesis of castor-oil based polyurethanes bearing alkene/alkyne groups and subsequent thiol-ene/yne post-modification, *Polymer (Guildf)*. 103, 163–70, 2016.

111. K. Czamara; K. Majzner; M. Z. Pacia; K. Kochan; *et al.*, Raman spectroscopy of lipids : a review, *J. Raman Spectrosc.* (December), 2014.
112. F. Oliveira; D. Henrique; R. Melo; V. B. Veronese; *et al.*, Study of Castor Oil Polyurethane - Poly ( Methyl Methacrylate ) Semi- Interpenetrating Polymer Network ( SIPN ) Reaction Parameters Using a 2 3 Factorial Experimental Design, *Mater. Res.* 7(4), 539–543, 2004.
113. T. Gurunathan; S. Mohanty; S. K. Nayak, Isocyanate terminated castor oil-based polyurethane prepolymer: Synthesis and characterization, *Prog. Org. Coatings* 80, 39–48, 2015.

## ANEXOS

### **Anexo 1. Productos Académicos Derivados de esta Investigación**

#### *Presentación de Trabajos en Congresos Internacionales*

Presentación de Cartel Científico. “Castor Oil Based Polyurethane / Titanium Composite Foams”. XV Simposio Latinoamericano de Polímeros. Cancun – Riviera Maya, México. October 23th – 27th 2016.

Presentación de Cartel Científico. “Polyurethane / Titanium foamed composites for bone regeneration”. The 10th International Conference on Porous Metals and Metallics Foams, Metfoam 2017. Nanjing, China. September 14th – 17th 2017.

#### *Artículos Originales en Revistas Arbitradas y Enlistadas en JCR*

Aguilar-Perez FJ, Vargas-Coronado RF, Cervantes-Uc JM, et al. Preparation and characterization of titanium - segmented polyurethane composites for bone tissue engineering. J Biomater Appl. 2018;1–12.

Aguilar-Perez FJ, Vargas-Coronado RF, Cervantes-Uc JM, et al. Preparation and characterization of titanium - castor oil based polyurethane composite foams for bone tissue engineering. Sometido a la revista Journal of Cellular Plastics.