



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.  
Posgrado en Materiales Poliméricos

“Síntesis y caracterización de un soporte de poli(glicerol sebacato) para uso potencial en regeneración de nervio periférico”

Tesis que presenta  
William Alejandro Talavera Pech

En opción al título de  
MAESTRO EN CIENCIAS EN  
MATERIALES POLIMÉRICOS



Mérida, Yucatán, Enero 2013



## **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

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

Mérida, Yucatán, Marzo 2014



---

William Alejandro Talavera Pech





## RECONOCIMIENTO

**Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado:**

**“Síntesis y caracterización de un soporte de poli(glicerol sebacato) para uso potencial en regeneración de nervio periférico”**

**Perteneciente al Programa de Maestría en Ciencias (Materiales Poliméricos) del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. y fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Materiales bajo la dirección del Dr. Juan Valerio Cauch Rodríguez.**

Atentamente,

---

Dr. Felipe A. Vázquez Flota

Coordinador de Docencia



## CONTENIDO

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
<b>CAPITULO 1. MARCO TEORICO .....</b>	<b>3</b>
1.1 INTRODUCCION.....	3
1.2 ANTECEDENTES.....	8
1.2.1 Reacción de los nervios ante traumatismos. ....	16
1.2.2 Propiedades ideales de un conducto para regeneración de nervios. ....	17
1.2.3 Estructura del andamio. ....	20
1.2.4 Poli(glicerol sebacato) PGS .....	22
1.2.5 Valproato de sodio .....	27
1.3 JUSTIFICACION .....	28
1.4 HIPOTESIS .....	30
1.5 OBJETIVOS .....	31
1.5.1 Objetivo general.....	31
1.5.2 Objetivos específicos. ....	31
<b>CAPITULO 2 MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>32</b>
2.1 Síntesis del PGS.....	32
2.2 Medición de la densidad.....	32
2.3 Medición del porcentaje de hinchamiento y densidad de entrecruzamiento. ....	33
2.4 Hidrofilicidad y absorción de agua .....	35
2.5 Caracterización.....	36
2.5.1 Caracterización espectroscópica (FTIR) .....	36
2.5.2 Caracterización térmica (DSC, TGA, DMA).....	36
2.5.3 Caracterización estructural (DRX) .....	37
2.6 Caracterización mecánica.....	37
2.6.1 Ensayos mecánicos a tensión.....	37
2.6.2 Ensayos mecánicos a compresión. ....	38
2.7 Estudios de Degradación .....	38
2.7.1 Estudios de degradación acelerada.....	38
2.7.2 Degradación en PBS.....	38

2.6 Modificación con valproato .....	39
2.6.1 Síntesis de PGS + valproato.....	39
2.6.2 Caracterización espectroscópica (FTIR) .....	39
2.6.3 Caracterización térmica (DSC).....	39
2.6.4 Caracterización Mecánica .....	40
2.7 Pruebas biológicas.....	40
2.7.1 Viabilidad de linfocitos en presencia de PGS .....	40
<b>CAPITULO 3 DISCUSION Y RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
3.1 Apariencia visual del poli(glicerol sebacato).....	42
3.2 Estructura química determinada mediante FTIR .....	42
3.3 Determinación de la densidad, porcentaje de hinchamiento y densidad de entrecruzamiento. ....	45
3.4 Hidrofilicidad y absorción de agua.....	48
3.5 Caracterización físico-química .....	50
3.5.1 Comportamiento térmico mediante DSC .....	50
3.5.2 Comportamiento térmico mediante TGA.....	53
3.5.3 Comportamiento térmico mediante DMA.....	54
3.6 Análisis estructural mediante DRX .....	56
3.7 Caracterización mecánica .....	58
3.7.1 Ensayos mecánicos a tensión .....	58
3.7.2 Pruebas mecánicas a compresión .....	61
3.8 Estudios de Degradación .....	62
3.8.1 Degradación acelerada .....	62
3.8.2 Degradación/absorción de PBS .....	62
3.9 Modificación con valproato de sodio .....	63
3.9.1 Caracterización térmica .....	66
3.9.2 Caracterización mecánica .....	68
3.9.3 Viabilidad celular evaluada por MTT. ....	69
CONCLUSIONES.....	72
TRABAJO FUTURO.....	73
BIBLIOGRAFÍA .....	74

## RESUMEN

El sistema nervioso humano se divide, con fines anatómicos, en dos componentes: el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP). A diferencia del SNC, el SNP no se encuentra protegido por huesos por lo cual se encuentra expuesto a daños mecánicos tales como la neuropraxia (contusión), axonotmesis (compresión) y neurotmesis (sección). La neurotmesis se puede atacar mediante la ingeniería de tejidos por medio de la tubulización con la ayuda de una guía nerviosa, generalmente de tipo polimérico. En este estudio se propone la obtención de un material biocompatible, con el cual se pueda construir una guía nerviosa a base de poli(glicerol sebacato) PGS modificado con valproato de sodio. El PGS es un poliéster biocompatible, totalmente biodegradable y cuyos productos de degradación no son tóxicos con propiedades mecánicas moduladas mediante su grado de entrecruzamiento. Inicialmente el polímero fue sintetizado a 110°C, 120°C y 140°C; se determinó su estructura química por espectroscopia de infrarrojo, FTIR, se determinaron sus propiedades térmicas por Calorimetría Diferencial de Barrido, DSC, por Termogravimetría, TGA, y mediante Análisis Dinámico Mecánico, DMA, y sus propiedades mecánicamente por ensayos de tensión y compresión. Se pudo observar que la temperatura de curado es el factor que determina el grado de entrecruzamiento, el cual aumenta si se aumenta dicha temperatura y, por lo tanto, afecta las propiedades finales del material, tales como, temperaturas de cristalización y fusión, módulo de Young, temperatura de transición vítrea, porcentajes de absorción de disolvente y cantidad de fracción soluble. Con base en los resultados obtenidos, el PGS curado a 120 °C fue modificado con valproato de sodio (5, 10 y 15 %), que ha mostrado poseer beneficios en regeneración nerviosa. Se observó que, al modificar el PGS con el valproato de sodio, sus propiedades químicas, térmicas y mecánicas cambian manteniendo las características necesarias para poder crear una guía nerviosa, incluyendo buenas propiedades biológicas, como lo es la citocompatibilidad a linfocitos determinadas mediante el ensayo MTT.



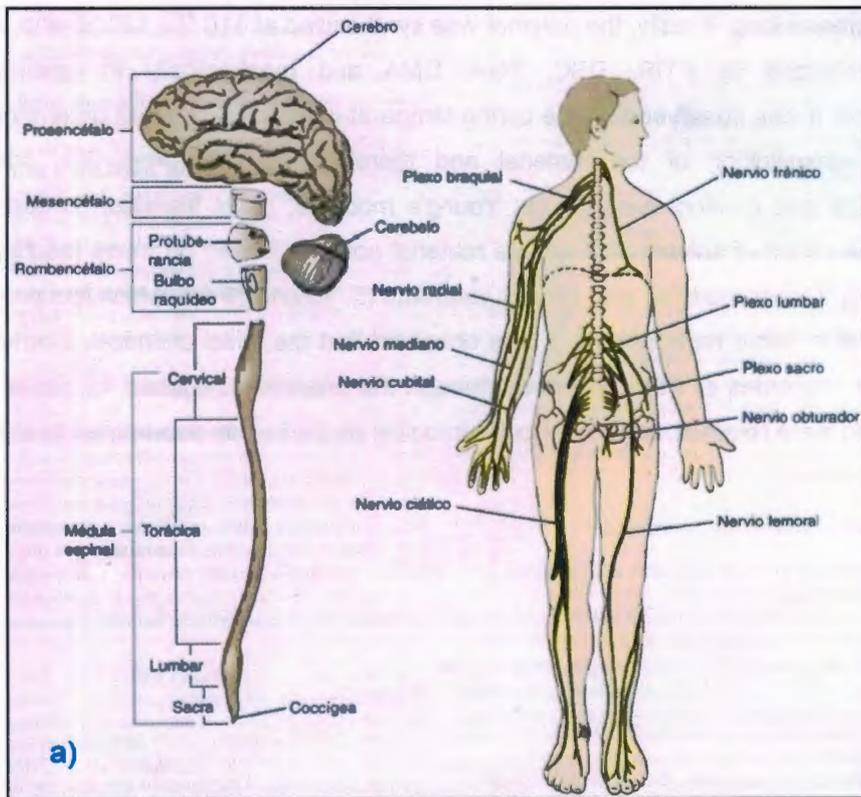
## ABSTRACT

The human nervous system is anatomically divided in the central nervous system (CNS) and peripheral nervous system (PNS). Unlike the CNS, the PNS is not protected by bones and therefore, exposed to mechanical damage such as neuropraxia (concussion) axonotmesis (compression) and neurotmesis (section). The neurotmesis can be treated by tissue engineering tubulisation with the assistance of a polymeric nerve guide. In this study, a nerve guide based on poly(glycerol sebacate) PGS modified with sodium valproate is proposed. PGS is a biocompatible polyester, completely biodegradable and whose degradation products are non-toxic, with mechanical properties tailored by its degree of crosslinking. Initially, the polymer was synthesized at 110 °C, 120 °C and 140 °C and characterized by FTIR, DSC, TGA, DMA and mechanically in tension and compression. It was observed that the curing temperature is the factor that determines the degree of crosslinking of the material and therefore its final properties, such as crystallization and melting temperature, Young's modulus, glass transition temperature, rates of absorption of solvent and soluble material content. Based on these results, PGS cured at 120 °C was modified with sodium valproate (5, 10 and 15 %), which has proven to be beneficial in nerve regeneration. It was observed that the initial chemical, thermal and mechanical properties of PGS changed although the properties required for nerve guide regeneration were retained, including good biological properties as determined by the MTT assay.

# CAPITULO 1. MARCO TEORICO

## 1.1 INTRODUCCION

El sistema nervioso humano se divide, con fines anatómicos, en dos grandes componentes: el sistema nervioso central (SNC) que incluye las estructuras nerviosas del cerebro y médula espinal situadas dentro del cráneo y conducto raquídeo respectivamente, y el sistema nervioso periférico (SNP) que a su vez involucra a todos los axones aferentes y eferentes del SNC y a las neuronas localizadas por fuera de esas estructuras centrales. En la figura 1 podemos ver una representación del sistema nervioso central y periférico (Snell, 2001):



a)

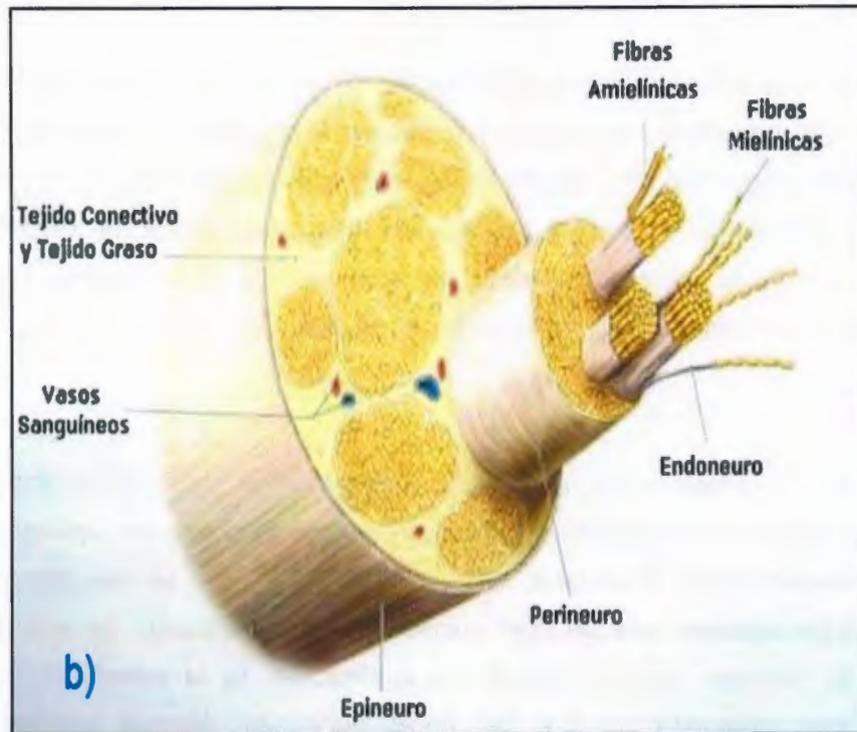


Figura 1.1a) Sistema nervioso central (izquierda), sistema nervioso periférico (derecha), b) Nervio periférico.

Al ser el SNP un sistema aferente y eferente, es el medio de unión entre el SNC y los órganos periféricos. Además, el SNP juega un papel importante en el correcto funcionamiento del organismo, ya que es el conducto por el cual se pueden llevar a cabo funciones tanto voluntarias, por ejemplo, saludar con la mano o escribir en un teclado como involuntarias, por ejemplo, control de la frecuencia cardíaca y fuerza de contracción, contracción y dilatación de vasos sanguíneos, lo mismo que la contracción y relajación del músculo liso en varios órganos, acomodación visual, tamaño pupilar y secreción de glándulas exocrinas y endocrinas.

La principal diferencia entre el SNP y el SNC está en que el sistema nervioso periférico no está protegido por huesos o por la barrera hematoencefálica, lo que permite la exposición a toxinas y daños mecánicos. Al encontrarse sin protección, el sistema nervioso periférico es susceptible de sufrir traumatismos. Las lesiones en los nervios periféricos se clasifican en 3 tipos (Snell, 2001):

## Neuropraxia

También llamada axonopraxia. Es la condición en la cual, como resultado de un accidente poli traumático, contusión, compresión o isquemia se produce falla o pérdida de la conducción nerviosa, debido a un corte, sin poderse demostrar daño estructural del nervio. Como única alteración microscópica podría encontrarse fragmentación de la vaina de mielina en relación a la zona traumatizada, la parálisis es incompleta y la recuperación rápida y completa.

## Axonotmesis

Lesión de nervio caracterizada por el daño de los axones, pero conservando más o menos intactos los envoltorios conectivos (endoneuro, perineuro, epineuro) del nervio; la degeneración Walleriana, que es la forma en que se denomina a los cambios degenerativos que se dan cuando se corta el axón de una célula nerviosa, se produce periféricamente. La explicación de la recuperación más rápida y más completa es que las fibras nerviosas, aunque severamente lesionadas, en su mayor parte, conservan sus relaciones anatómicas normales debido a la conservación de las vainas de tejido conectivo. La causa más frecuente son las lesiones por aplastamiento, la tracción y la compresión

## Neurotmesis

Este término se refiere a cualquier lesión del nervio (parcial o completo) con disrupción completa del axón y su vaina de mielina. El daño de los elementos de tejido conectivo consiste en una sección anatómica completa o parcial, o bien fibrosis intraneural. Aunque, en apariencia, se mantenga la continuidad macroscópica del nervio, no se puede producir regeneración espontánea. La pérdida de la función nerviosa es completa (sensitiva o motriz) y la única posibilidad de recuperación es la intervención quirúrgica.

Hasta ahora no existe un método satisfactorio para reparar estos defectos en los nervios, por lo que las heridas en nervios periféricos continúan siendo uno de los problemas más difíciles enfrentados por los cirujanos.

La reparación de tejido nervioso y las estrategias de regeneración han recibido mucha atención debido a que las lesiones en los nervios afectan directamente la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, a pesar de que hay varios métodos de microcirugía para favorecer la reparación de nervios, los resultados clínicos permanecen decepcionantes y se necesitan mejores estrategias.

Con el fin de enfrentar esta problemática, se ha descubierto un nuevo material, el poli(glicerol sebacato), PGS, un poliéster elastomérico biodegradable que ha mostrado tener una serie de características que le proporcionan algunas ventajas sobre materiales previamente utilizados para esta misma aplicación. Al modificar este nuevo material con valproato, el cual ha demostrado ayudar en la diferenciación de células madre hacia el linaje neuronal, presentará ciertas características que favorecerán la regeneración nerviosa y se esperan aún mejores resultados en el tratamiento de defectos nerviosos. Las heridas (daños) en los nervios periféricos se pueden tratar por la vía de la ingeniería de tejidos, que busca en este caso, la regeneración de tejido nervioso. Esto se ha intentado ya en investigaciones anteriores, con una gran cantidad de materiales, pero los resultados siguen siendo pobres, debido a que todos los materiales utilizados conducen a reacciones adversas, como características pro-inflamatorias, fibrosis, o formación de neuromas. Asimismo, estos materiales son poco compatibles con el huésped, debido a diversos factores como su citotoxicidad, incompatibilidad inmunológica, baja degradabilidad o que las sustancias liberadas durante su degradación son tóxicas, y finalmente, la falta de coincidencia entre las dimensiones o las propiedades mecánicas del nervio y del injerto.

El poli(glicerol sebacato) PGS ha mostrado ser, dentro de estos materiales una opción viable, debido a su comprobada biodegradabilidad, biocompatibilidad, y sus propiedades mecánicas semejantes a las del nervio periférico nativo (Sundback *et al.* 2005). Sin embargo, aún no existen estudios sobre cómo se comporta cuando

ha sido modificado con el valproato, el cual le puede conferir propiedades distintas para el tratamiento de enfermedades nerviosas. En efecto, éste último es un medicamento de aplicación en el campo de las enfermedades nerviosas y ha mostrado algunas propiedades favorables para la diferenciación de células madre a células neurales, y a la mejora en viabilidad y proliferación de células de Schwann.

Por lo tanto, en este trabajo el PGS fue sintetizado, caracterizado y modificado con el valproato, llevando a cabo las pruebas fisicoquímicas, mecánicas y de degradación, con el fin de conocer a fondo sus propiedades antes de evaluar su alcance en la regeneración de tejido nervioso.

Se espera que los resultados de este proyecto conlleven a la creación de un conducto, a base de este nuevo material, que promueva la reparación de heridas en nervios periféricos, y con las pruebas necesarias se compruebe que la regeneración o reparación de tejido nervioso es posible, reduciendo o incluso desapareciendo las reacciones adversas que se han presentado ya con los diferentes materiales utilizados para este mismo propósito.

Este trabajo de investigación se encuentra dividido en las siguientes secciones:

- Antecedentes
- Justificación
- Hipótesis
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Discusión y resultados
- Conclusiones
- Trabajo futuro

## 1.2 ANTECEDENTES

La reparación de nervios dañados, no es un tema nuevo, ya que se ha intentado por diferentes técnicas desde hace muchos años. Los primeros reportes de estudios realizados con este fin datan del año de 1836, siendo el primer estudio controlado el de Howell y Huber en el año de 1893; se llevó a cabo en perros, y se observó el proceso de curación después de hacerles una herida (Raffe 1985).

El interés por la investigación sobre técnicas de reparación de nervios dañados aumentó después de la primera guerra mundial, ya que se realizaron numerosas cirugías para la reparación de dichos nervios en muchos de los pacientes con heridas traumáticas que dejó esta guerra. Sin embargo, muy pocos reportes y técnicas son compatibles con los conocimientos actuales sobre la regeneración de tejidos nerviosos.

La investigación en esta área se intensificó nuevamente en la década de los 30's (1930) estimulada por la anticipación a un conflicto global próximo. Como resultado de la investigación llevada a cabo en este periodo se obtuvieron las bases del conocimiento actual de la degeneración y regeneración de los nervios y el curado de heridas quirúrgicas.

En las últimas décadas han aumentado los conocimientos básicos sobre las heridas de nervios y su reparación incluyendo investigación en la biología básica de los nervios, factores que contribuyen a la regeneración de heridas, y las diversas técnicas de reparación como los del auto injerto, aloinjertos, y las guías nerviosas. A continuación se presentan en la tabla I los antecedentes en materia de regeneración nerviosa:

Tabla I Estrategias en los primeros experimentos realizados para estudiar la regeneración nerviosa.

Material	Modelo Animal	Nervio	Tamaño de herida	Duración de análisis	Porosidad	Resultados y observaciones	Referencia
Tubo de silicón	Ratas	Ciático	10 mm	545 días	No	Mielinización entre días 14 y 21. Células Schwann y axones migran tras fibroblastos. Unión de herida entre día 28 y 35. Demielinización al día 56 y para el día 435 75% de las fibras se encontraron dañadas.	(Jean M. Lw Beau <i>et al.</i> 1988)
Membranas tubulares de polisulfona	Hámster	Ciático	8 mm	8 semanas	Si	Guías con dos tipos de permeabilidad para moléculas de $10^5$ y $10^6$ Da. Encontraron los mejores resultados en el de más baja permeabilidad, posiblemente por el control en el intercambio de moléculas entre el lumen del canal y el ambiente externo.	(P. Aebischer <i>et al.</i> 1989)
Constructo de PLLA/PCL	Ratas	Ciático	10 mm	18 meses	Si	El modelo fue un tubo de dos capas la interna lisa y la externa, porosa, ambas del mismo material. Mostraron no ser tóxicas. La degradación de la capa lisa se inicia a 1 mes de implantación y 18 meses después se encontró completa fragmentación del material; se observó recuperación motriz y sensorial en todas las guías.	(W. F. A. Den Dunnen <i>et al.</i> 1993)

Conducto de PLLA y PLGA	Ratas	Ciático	20mm	3 meses	No	Conductos del material conteniendo desde 1 hasta 5 sublúmenes. Mínima respuesta inflamatoria en las muestras. El análisis histológico demostró presencia de cables axonales en los canales de lumen simple. Los conductos multiluminares demostraron pobres resultados.	(Hadlock T. E. J. <i>et al.</i> 1998)
Guía nerviosa bicapa. (copoliéster /poliuretano -PLLA)	Ratas	Ciático	8mm	16 semanas	Si	Se usó la guía nerviosa con o sin ACTH4-9 que es un factor de crecimiento nervioso. Permitieron exitosamente la regeneración, restableciendo el contacto entre la región distal y proximal. Se observaron buenos cables nerviosos sin cicatrices endoneurales.	(Peter H. Robinson <i>et al.</i> 1991)

Debido a los problemas asociados con los daños al sistema nervioso periférico, se continúan los esfuerzos para la generación de un conducto que permita la reparación de los nervios periféricos. Aunque, muchos materiales han sido probados para estos fines, incluyendo materiales naturales o sintéticos, éstos pueden exhibir hinchamiento y características pro-inflamatorias.

Entre los sustitutos naturales, el material más utilizado para reparar nervios periféricos es el mismo nervio del paciente (técnica de auto injerto) (Lundborg *et al.* 1988). Sin embargo, con esta técnica se tiene que igualar el calibre del donador con el del nervio receptor en términos de diámetro total y densidad promedio de axones. Esto provoca un gran número de desventajas, incluyendo la pérdida de función neural en la región donadora del injerto de nervio, falta de coincidencia entre las dimensiones del nervio y del injerto, probabilidad de formación de neuroma, vida corta de los nervios debido a que son tomados del paciente, y esto usualmente involucra un segundo sitio de cirugía, es decir, nervios sanos tienen que ser sacrificados. En conclusión la principal desventaja de este procedimiento es el resultado funcional insuficiente.

Entre los sustitutos naturales también se han utilizado arterias (Lundborg *et al.* 1981), venas (Suematsu *et al.* 1988) y canales de hueso descalcificados (Hadlock *et al.* 1998), pero ninguno de estos ha superado la técnica del auto injerto, que es la más utilizada hasta ahora. Algunos investigadores han utilizado injertos alogénicos que son tomados de cadáveres, pero su oferta está limitada y pueden sufrir rechazo inmunológico de los huéspedes. También se han utilizado los injertos nerviosos acelulares (Kim *et al.* 2004) pero sus estudios se han retrasado debido a su falta de células conductoras, regeneración nerviosa y remodelación de la matriz extracelular.

Los conductos sintéticos, también se encuentran en investigación para reparar defectos cortos en los nervios periféricos, donde el objetivo es obtener resultados clínicos superiores a los actualmente obtenidos con el auto injerto. Este tipo de implantes elimina la necesidad de coleccionar nervios propios del paciente y, por lo tanto, previenen la pérdida funcional y el daño de tejido sano del sitio donador. En

este grupo se encuentran los polímeros bioestables como el silicón, polímeros degradables tales como el poli(ácido láctico-glicólico) PLGA, la poli( $\epsilon$ -caprolactona), PCL, el poli(L-ácido láctico), PLLA; y los polímeros intrínsecamente conductores (polipirrol y polianilina) (Subramanian *et al.* 2009). Los conductos fabricados con materiales no degradables son recibidos por el huésped como un cuerpo extraño y favorecen la respuesta inflamatoria o causan heridas por compresión, limitando así la regeneración nerviosa. Los polímeros conductores son una opción viable, pero su biocompatibilidad aún no ha sido probada. Los materiales biodegradables ofrecen mejores perspectivas debido a que no necesitan ser removidos en una segunda cirugía, la cual se lleva a cabo para eliminar el dolor en el nervio, que puede darse por un largo periodo de tiempo, cuando se usan materiales no degradables.

La tabla II es un resumen de los diferentes materiales que se han utilizado recientemente para la regeneración de nervios:

Tabla II . Materiales utilizados recientemente para regeneración de nervio periférico

BIOMATERIALES	MODIFICACION/METODO DE FABRICACION	PROPIEDADES	REFERENCIA
Poli(etilén glicol)	Incorporación de polisacárido (Heparina)	Propiedades físicas y mecánicas variables capaces de adaptarse a los requerimientos del tejido por suplir. Permite la unión covalente de células.	(Uwe <i>et al.</i> 2009)
Quitosano	Modificado con (γ-glicidoxipropiltrimetoxisilano). Hidrogel termo sensible funcionalizado con polilisina.	Bajo costo, mejora la curación de heridas y efectos antibacteriales, proliferación de células, elongación de axones y mielinización. Andamio inyectable; compatibilidad mecánica; propiedades de la superficie (humectabilidad, densidad de carga.), sensibilidad térmica, baja tensión interfacial.	(Amado <i>et al.</i> 2008), (Crompton <i>et al.</i> 2007)
Poli(ácido sialico)	Hidrogel modificado con Poli-L-lisina, Poli-L-ornitina, colágeno o laminina.	Compatibilidad mecánica, migración celular, crecimiento y orientación de axones, es degradable sin efectos tóxicos en células de Schwann.	(Hailey <i>et al.</i> 2008)
Poli(β-hidroxi butirato)	Películas impregnadas con moléculas de matriz extracelular.	Adhesión y proliferación celular.	(Novikova <i>et al.</i> 2008)

<b>Poli(<math>\epsilon</math>-caprolactona)</b>	Electrohilado y unión térmica de fibras. Fibras alineadas por electrohilado. Electrohilado (mezcla polimérica con colágeno)	Resistencia mecánica, favorece la velocidad de proliferación y cantidad de elongación de neuritas. Contacto orientado, promueve maduración de células, mejora la elongación de neuritas. Propiedades biológicas (adhesión, proliferación y diferenciación de células de Schwann), secreción de fibronectina, contacto orientado.	(Lee <i>et al.</i> 2008), (Chew <i>et al.</i> 2008), (Schnell <i>et al.</i> 2007)
<b>Poli(ácido láctico-co-glicólico)</b>	Método de precipitación inmersión modificado	Permeabilidad selectiva; hidrofiliidad, nano porosidad, resistencia mecánica.	(Oh <i>et al.</i> 2008)
<b>Poli(D-L-láctico-co-<math>\epsilon</math>-caprolactona) [PDLLA/CL]</b>	Modificado con recubrimiento de PPy y PPy nano compuestos de PDLLA Y CL	Señales eléctricas para funciones multitudinarias de las células, tolerancia de dimensiones, geometría similar a los auto injertos.	(Zhang <i>et al.</i> 2007)
<b>Colágeno</b>	Hidrogel entrecruzado con dendrímeros modificados del péptido YIGSR.	Funciones biológicas (favorecen el crecimiento de células epiteliales corneales y el crecimiento de neuritas).	(Duan <i>et al.</i> 2007)
<b>Poli(glicerol sebacato)</b>	Réplica de moldeo	Flexibilidad; degradación superficial, hidrofiliidad, características mecánicas variables, buena respuesta al contacto orientado.	(Bettinger <i>et al.</i> 2006)

<p><b>Poli(ácido láctico- coglicólico).</b></p>	<p>Método de micro trenzas          Moldeo por inyección/          separación de fases          inducida térmicamente.</p>	<p>Flexibilidad, porosidad, permeabilidad, fácilmente adaptable a sistemas vivos, fácil sutura a las heridas nerviosas.          Porosidad; canales alineados longitudinalmente; geometría similar al auto injerto, tolerancia en sus dimensiones.</p>	<p>(Bini <i>et al.</i> 2004)          (Sundback <i>et al.</i> 2003)</p>
<p><b>Poli(2-hidroxietilmetacrilato)</b></p>	<p>Técnica de plantillas de fibras.          Modificado con metacrilato de metilo.</p>	<p>Andamio orientado; características físicas similares a las del tejido suave, fácil implantación.          Propiedades mecánicas similares a las de la medula espinal, formulación química variable</p>	<p>(Flynn <i>et al.</i> 2003)          (Dalton <i>et al.</i> 2002)</p>

### **1.2.1 Reacción de los nervios ante traumatismos.**

Con base en todas las investigaciones previamente mencionadas se pudieron conocer los mecanismos por medio de los cuales los nervios reaccionan ante heridas de cualquier tipo (*neuropraxia, axonotmesis o neurotmesis*).

Las células nerviosas son capaces de unir fácilmente heridas o defectos menores a los 6 mm (Hailey *et al.* 2007). Sin embargo, en espacios más largos, como heridas de menor impacto en el SNP, se curan por la formación de un cable de fibrina a través de la herida. Esto permite a las células de Schwann migrar desde ambos extremos del nervio, para así orientar las bandas "bungner" y favorecer el crecimiento de neuritas. Actualmente, se encuentra en investigación una estrategia adecuada para lograr la formación de estas bandas (Subramanian *et al.* 2009). Además, después de una herida, la síntesis de proteínas y el mecanismo de degradación en los axones, juega un papel muy importante en la formación de conos. La mielinación del SNC es diferente a la del SNP. Los astrocitos y los oligodendrocitos encontrados en el SNC marcan una diferencia clave entre el SNC y el SNP en su respuesta a las heridas.

Por su parte, en el SNP son las células gliales de mielinación (células de Schwann) las que juegan un papel importante en la degradación Walleriana. Las células de Schwann favorecen la regeneración neural y la remielinización mediante la secreción de moléculas de adhesión de células neurales L1 (proteínas pertenecientes al grupo de las inmunoglobulinas), moléculas extracelulares (colágeno y laminina) y un grupo de factores tróficos como el factor de crecimiento nervioso (NGF por sus siglas en inglés), factor neurotrópico derivado del cerebro y neurotrofina-3.

### **1.2.2 Propiedades ideales de un conducto para regeneración de nervios.**

Investigaciones recientes en regeneración de nervios involucran la aplicación de la ingeniería de tejidos y esto le da una nueva perspectiva a la terapia neurológica. El éxito en el campo de la ingeniería de tejidos neurológicos está principalmente basado en la regulación del comportamiento celular y la progresión del tejido a través del desarrollo de un andamio sintético análogo a la matriz extracelular y que además pueda soportar cultivos celulares tridimensionales.

Para que un material pueda funcionar como sustituto de un tejido natural es deseable que tenga una composición similar o una estructura similar al tejido que se desea reemplazar. En el caso de los nervios, su estructura está basada en células nerviosas, las cuales consisten esencialmente en una masa de citoplasma en la cual está incluido el núcleo y está limitado externamente por una membrana plasmática. La célula nerviosa con todas sus prolongaciones es llamada neurona, cuyo tamaño y forma varían considerablemente, y posee un cuerpo celular desde cuya superficie se proyectan una o más prolongaciones denominadas neuritas. Las neuritas responsables de recibir información y conducirla hacia el cuerpo celular se denominan dendritas. La neurita tubular larga única que conduce impulsos desde el cuerpo celular se denomina axón. Las dendritas y los axones a menudo se denominan fibras nerviosas. Estas fibras nerviosas pueden ser mielínicas o amielínicas; en el caso particular del SNP, las células de Schwann son las encargadas de formar la mielina, la cual actúa como aislante y su composición es básicamente lipídica. Entre cada célula de Schwann se encuentra una parte del axón que no cuenta con protección mielínica, ésta parte es llamada nodo de Ranvier (Snell 2001). En la siguiente figura podemos ver el esquema de las neuronas (tomado de la página web: [http://www.med.ufro.cl/Recursos/neuroanatomia/archivos/3\\_neurohistologia\\_archivos/Page324.htm](http://www.med.ufro.cl/Recursos/neuroanatomia/archivos/3_neurohistologia_archivos/Page324.htm) el 02 de septiembre de 2012):

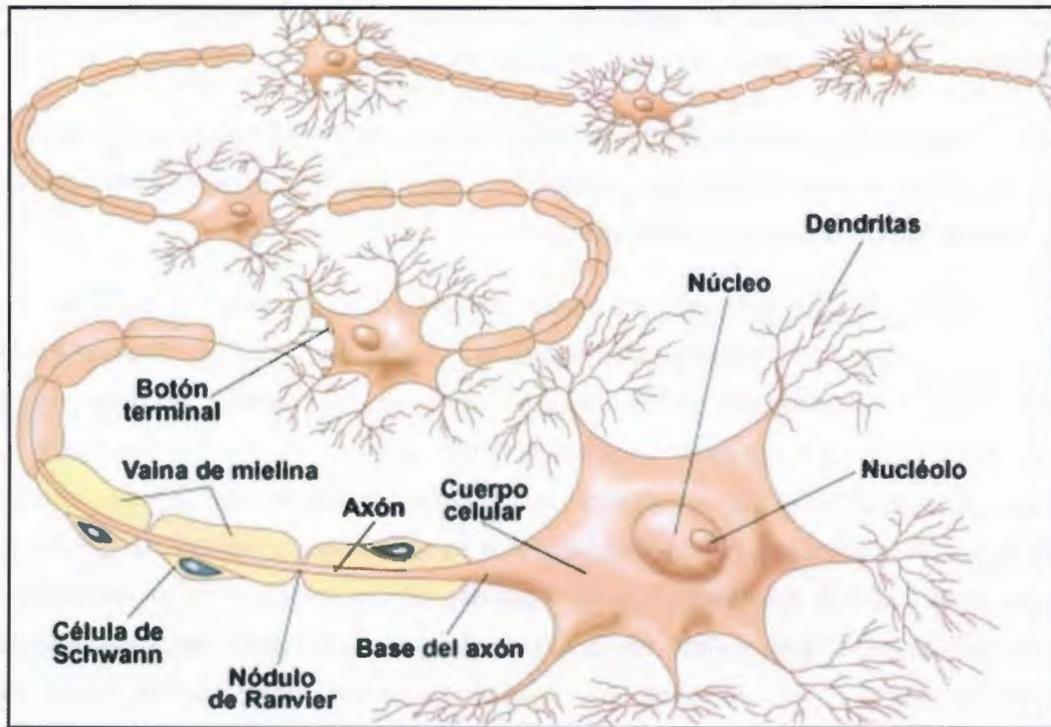


Figura 1.2 Estructura de una neurona.

Las propiedades ideales de un andamio para la regeneración de nervios son las siguientes (Subramanian *et al.* 2009): biocompatibilidad, baja respuesta inflamatoria, biodegradabilidad controlada, productos de degradación no tóxicos, porosidad adecuada para la vascularización y la migración celular, resistencia a infecciones, neuroconductor, neuroinductor, y con una estructura tridimensional para imitar a la matriz extracelular.

La biocompatibilidad es una propiedad clave para aplicaciones biomédicas en general, ésta es la habilidad del material de implantarse con una respuesta apropiada del huésped sin inflamación en los tejidos que lo rodean. La biodegradabilidad tiene igual importancia, ya que es la propiedad del material de ser descompuesto por las enzimas del cuerpo, y durante este proceso los

productos de degradación deben ser absorbidos por el huésped o, en última instancia, ser eliminados mediante procesos metabólicos.

El proceso de la regeneración de nervios requiere una coordinación perfecta entre la velocidad de la absorción del conducto y el tiempo necesario para el crecimiento y la maduración del nervio en el conducto.

El diámetro del conducto es otro factor importante. El diámetro y largo de los conductos debe ser ajustable para igualar al del sitio del implante. En el caso de los nervios, el diámetro varía desde 1 mm en los nervios faciales hasta aproximadamente 1 cm para el nervio ciático (Loaysa *et al.* 1995. Snell 2001), y debe permitir al conducto ser anclado en los extremos del nervio. La presencia de factores de crecimiento de nervios, agentes neurotrópicos y células de Schwann son otros factores que favorecen la regeneración de nervios. La permeabilidad también es importante y debe ser la adecuada, ya que un conducto impermeable permite que el fluido y las células colectadas en los extremos del nervio se mantengan en la región de regeneración de nervios, pero limita el suministro de nutrientes y la eliminación de materiales de desecho; por otro lado, un conducto con permeabilidad excesiva puede provocar que las células no se mantengan en el conducto o la entrada de las células encargadas de la cicatrización de heridas las cuales podrían bloquear el lumen (abertura) del conducto.

Una de las propiedades más importantes para la aceptación del injerto por el tejido huésped es la estabilidad mecánica del andamio, que si no es la adecuada puede llevar a la necrosis y la inflamación. Para la ingeniería de tejidos de nervio, el andamio debe ser flexible, inofensivo a los tejidos que lo rodean, resistente al colapso estructural durante la implantación.

La propiedad de adhesión celular de un andamio depende principalmente de las características de su superficie como la densidad de carga y la hidrofiliidad. La mayoría de los polímeros biodegradables sintéticos son hidrofóbicos lo cual limita su uso en ingeniería de tejidos.

La química de la superficie de los andamios es considerada como el parámetro más importante en ingeniería de tejidos. La matriz extracelular en sistemas biológicos mantiene las células juntas y les provee de un medio para interactuar y migrar. Así, es deseable que el andamio imite a la matriz extracelular en el favorecimiento de adhesión, proliferación y diferenciación celular, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Una recuperación inadecuada de un nervio ante un corte se ha relacionado con (Sundback et al. 2005):

- I. La velocidad de resorción no está bien sincronizada con la formación de tejido nervioso.
- II. Las propiedades mecánicas no están igualadas a las del nervio nativo.
- III. En la degradación se da hinchamiento y deformación del conducto.
- IV. Ocurre una respuesta inflamatoria considerable del tejido que rodea el implante.
- V. La permeabilidad del conducto es baja.

### **1.2.3 Estructura del andamio.**

Hay diferentes técnicas para la fabricación de andamios de varias geometrías, con la porosidad deseada y superficie de andamiaje celular. Estas técnicas incluyen la disolución en algún disolvente, lixiviación de partículas, moldeo por fundición, etc. Dentro de las diferentes formas de andamios (nano fibras, nano espumas, hidrogeles, nanotubos, etc.), los hidrogeles (Durury *et al.* 2003) y las nano fibras (Cao H *et al.* 2009) han sido extensamente investigados para su uso como andamios en regeneración neural.

En años recientes, los hidrogeles han recibido considerable atención como materiales adecuados para la ingeniería de tejido nervioso, ya que proporcionan un adecuado microambiente tanto químico y mecánico como espacial, parecido al de la matriz extracelular natural, el cual apoya la extensión de neuritas para la

proliferación y diferenciación celular, así como para la extensión de axones. Además, son biocompatibles y poseen propiedades mecánicas similares a las del tejido suave (blando), baja tensión superficial. Por ejemplo, debido a sus propiedades neuroinductivas, neuroconductoras y a su biocompatibilidad, el hidrogel de poli [N-(2-hidroxipropil) metacrilamida] (PHPMA) ha sido muy utilizado para reparar defectos de tejidos en el SNC promoviendo tanto la formación de tejido de matriz extracelular como el crecimiento axonal (Woerly *et al.* 1998). En los hidrogeles las células se introducen con facilidad en los precursores líquidos del gel. La producción de constructos poliméricos de hidrogel basados en células se ha previsto para la sustitución de tejidos en el SNC con propiedades fisicoquímicas combinadas, tales como biocompatibilidad, estabilidad, porosidad e hidrofilia, junto con el reconocimiento biológico como la expresión de receptores de superficie bioespecíficos y síntesis de moléculas bioactivas.

Las nano fibras parecen tener la estructura más prometedora en aplicaciones de ingeniería de tejidos debido a su parecido a la matriz extracelular. El término nano fibra se utiliza para nombrar a aquellas estructuras fibrosas con un diámetro menor a un micrómetro. Su extraordinaria resistencia mecánica y área superficial por volumen hace a las nano fibras las más adecuadas para la aplicación específicamente en ingeniería de tejidos nerviosos.

Varias técnicas se han reportado para generar nano fibras incluyendo la síntesis por medio de una plantilla (*template synthesis*), separación de fases, auto-ensamblado y el electrohilado (*electro spinning*). Dentro de todas estas técnicas el electrohilado ofrece ciertas ventajas, como su facilidad de operación, mejor control de las propiedades de las fibras (diámetro, longitud e incluso orientación) y resultados adecuados tanto en la producción de fibras con diámetros en el intervalo de los nanómetros como en la encapsulación de materiales para la formación de fibras recubiertas (electrohilado coaxial).

Los conductos con canales alineados longitudinalmente han mostrado mejores resultados que los conductos huecos para reparar roturas o defectos grandes en los nervios (Chew *et al.* 2008). Se encontró que las nano fibras alineadas apoyan la orientación celular y mejoran el crecimiento de neuritas y la dirección de crecimiento.

#### **1.2.4 Poli(glicerol sebacato) PGS**

El poli(glicerol sebacato) es un material flexible elastomérico, con la posibilidad de una gran deformación reversible con una recuperación casi completa en ambientes dinámico-mecánicos. Esta propiedad lo hace atractivo para su aplicación en la ingeniería de tejido blando. También, su naturaleza flexible lo hace adecuado para ser utilizado en contornos difíciles del cuerpo, en los cuales, los polímeros frágiles y duros no pueden emplearse.

El PGS es un polímero biodegradable, transparente casi incoloro, utilizado en aplicaciones biomédicas, tales como soporte en la regeneración de arterias (Crapo *et al.* 2010), de tejido del miocardio (Chen *et al.* 2008), de retina (Neeley *et al.* 2008), entre otras; es un poliéster preparado por la policondensación del glicerol y el ácido sebácico. Este material es resistente, con propiedades elastoméricas termoestables, es bioabsorbible pues puede degradarse y ser absorbido, y sus productos de degradación son eliminados por vías naturales y su producción es relativamente barata.

En la investigación original llevada a cabo por Wang *et al.* (2002) se sintetizó el PGS en dos etapas: 1) el paso de pre-policondensación y 2) el paso de entrecruzamiento. Para el paso de pre-policondensación una mezcla equimolar de los monómeros fue calentada a 120 °C durante 24 h bajo flujo de argón, después la presión fue reducida de 1 a 40 mTorr y se siguió calentando la mezcla a la misma temperatura por 48 h más. Este método convencional de síntesis en dos etapas ha sido muy utilizado en investigaciones para la síntesis de PGS.

El poli(glicerol sebacato) es un polímero que varía su carácter hidrofílico, pues en la investigación realizada por Wang *et al.* (2002), se presentó un ángulo de contacto con el agua de 32°, mientras que el estudio realizado por Alpesh Patel *et al.* (2011) presentó un ángulo de contacto de 77.5°. Respecto a sus propiedades térmicas, se ha encontrado que el PGS tiene dos temperaturas de cristalización, una localizada a -52.14 °C y otra a -18.50 °C. Del mismo modo, se han reportado dos temperaturas de fundido, localizándose una a 5.23 °C y la otra a 37.62 °C (Wang *et al.* 2002). Sin embargo, éste comportamiento no fue observado en estudios más recientes (Jaafar 2010, Liu *et al.* 2007 ). En el estudio original de Wang *et al.* (2002) no se observó la temperatura de transición vítrea por encima de los -80 °C, ya que fue el límite de temperatura del equipo utilizado. Por su parte, Jaafar *et al.* (2010) reportaron la Tg entre -30 y -40 °C. Los resultados del DSC indican que el polímero es totalmente amorfo a 37 °C.

Los monómeros utilizados en la síntesis del PGS son inofensivos. El glicerol está presente como un bloque básico de construcción en los lípidos, mientras que el ácido sebácico es el intermediario metabólico natural en la  $\omega$ -oxidación de los ácidos grasos de cadena mediana y cadena larga. La FDA aprueba al glicerol como humectante en comida y a los polímeros que contienen ácido sebácico para aplicaciones médicas.

La estructura de los monómeros y el polímero formado se muestra en la Figura 1.3:

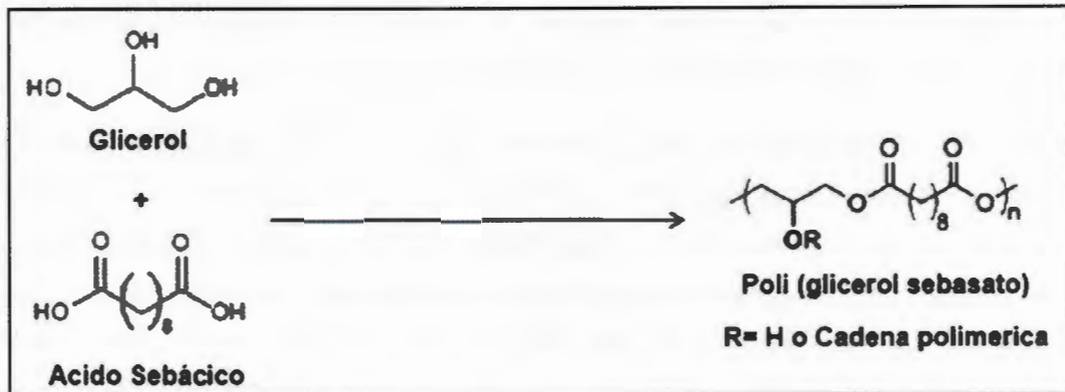


Figura 1.3 Estructura molecular del glicerol, ácido sebácico y del Poli (glicerol sebasato) PGS.

Para el diseño de éste material y para su utilización como andamio para regeneración nerviosa se toman en cuenta 5 criterios importantes (Wang *et al.* 2002):

1. Debe degradarse preferentemente por vía hidrolítica, para reducir la variación en la cinética de degradación causada por degradación enzimática.
2. Los enlaces éster favorecen la degradación hidrolítica.
3. Se necesita un bajo grado de entrecruzamiento entre las cadenas poliméricas que lo conforman.
4. Los enlaces químicos entrecruzados necesitan ser hidrolizables e idénticos a los de la cadena principal para reducir la posibilidad de degradación heterogénea.
5. Los reactivos no deben ser tóxicos, al menos uno debe ser trifuncional y al menos uno debe proporcionar grupos hidroxilo para la formación de puentes de hidrógeno.

Los grupos hidroxilo unidos a los carbonos de la cadena principal contribuyen a la hidrofiliidad del polímero, mientras que los grupos carboxílicos del ácido sebácico

son los que forman las uniones éster en el material entrecruzado, cuya densidad aumenta si se aumenta el tiempo y la temperatura de entrecruzamiento.

Su curva de esfuerzo contra deformación (figura 1.4) es similar a la del hule natural y su naturaleza elastomérica es debida a su entrecruzamiento covalente, y a que es una red tridimensional de espirales al azar con grupos hidroxilo unidos a su matriz. Al ser un material entrecruzado, su prepolímero es soluble en una gran cantidad de disolventes orgánicos, pero el polímero final es insoluble. En la siguiente figura podemos observar una curva esfuerzo deformación en la cual se comparan el PGS, el caucho vulcanizado y el poli-4-hidroxibutirato.

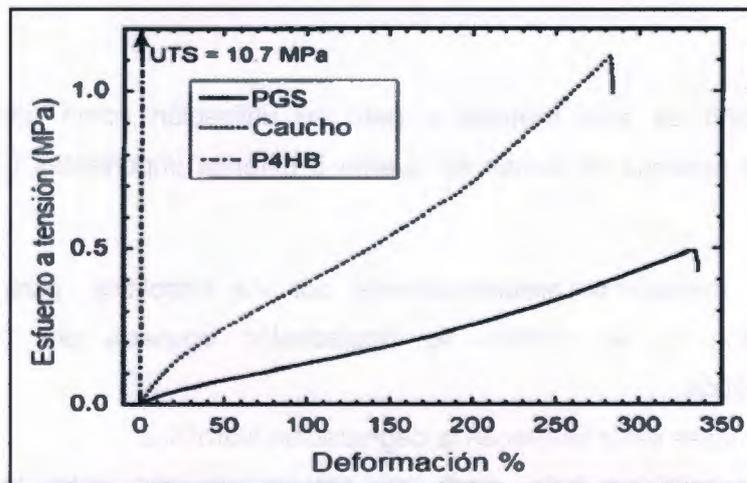


Figura 1.4 Curva esfuerzo-deformación del PGS, el caucho vulcanizado y el poli-4-hidroxibutirato (Wang et al. 2002).

En un estudio previo (Rai et al. 2012) se encontró que el valor del módulo de Young del PGS (en el intervalo de 0.0250-1.2 MPa) se encuentra entre el de los ligamentos y el del miocardio, siendo muy parecido al del nervio periférico (0.45 MPa), y su elongación máxima es similar al de las venas y el de las arterias (> 260%). Sin embargo, sus propiedades mecánicas y su cinética de degradación pueden ser controladas (moduladas) por la variación en la concentración de reactivos durante la etapa de prepolimerización, así como por el tiempo y la temperatura de curado durante la etapa de entrecruzamiento. Debido a esto, en la

literatura se encuentran reportados valores muy variables para las propiedades mecánicas del PGS, como se observa en la tabla III.

Tabla III variabilidad en propiedades mecánicas del PGS.

Referencia	Módulo de Young (MPa)	Elongación máxima (%)	Esfuerzo máximo (MPa)
(Alpesh Patel <i>et al.</i> 2011)	0.0239	40	0.69
(Qi-Zhi Chen <i>et al.</i> 2008)	0.056-1.2	40-260	0.23-0.47
(Anna G. Mitsaka <i>et al.</i> 2011)	0.4-2.4	15-100	0.21-0.54
(Shu-Ling Liang <i>et al.</i> 2010)	0.38	159	0.42
(C. A. Sundback <i>et al.</i> 2012)	0.17-0.64	109-526	0.37-0.41

El PGS es un material semicristalino, según fue demostrado en un análisis de calorimetría diferencial de barrido llevado a cabo a muestras de PGS entrecruzadas a diferentes temperaturas y tiempos, y también se encontró que el grado de cristalinidad se reduce con el grado de curado (Jaafar *et al.* 2010)

Su mecanismo de degradación se da por la desaparición de los enlaces éster, es decir, se degrada por erosión de su superficie con una pérdida lineal de masa y resistencia, lo cual contribuye a que no se hinche. En un estudio de Wang *et al.* en 2003, se observó que, al implantarlo, su vida media de degradación era de 21 días y que al día 60 se observó una absorción completa. Asimismo, se reportó que su absorción de agua durante la degradación es mínima sin hinchamiento detectable.

Su biocompatibilidad se deriva de la biocompatibilidad de los reactivos utilizados en su síntesis y a que sus productos de degradación son generalmente

metabolizados naturalmente en el cuerpo. Estudios previos (Wang *et al.* 2002, Sundback *et al.* 2005) muestran que no tiene efectos perjudiciales en la actividad metabólica de las células, ni en su adhesión y proliferación, además de que no induce a la apoptosis (modalidad específica de muerte celular).

### **1.2.5 Valproato de sodio**

El ácido valproico, comúnmente utilizado en forma de sal sódica como valproato, es un medicamento antiepiléptico utilizado en el tratamiento de desórdenes bipolares y como estabilizador de humor.

Las células de Schwann, juegan un papel importante en el crecimiento de neuritas, ya que sirven como andamios de los axones en regeneración y producen varios factores tróficos para la regeneración de estos axones, además responden de manera favorable al ser expuestas a factores neurotróficos. El ácido valproico produce efectos similares a estos factores, además de que favorece el crecimiento de neuritas y la supervivencia celular. Existe evidencia que indica que aplicando ácido valproico local o sistemáticamente, se puede mejorar el crecimiento de neuritas y la recuperación de funciones motoras en ratas adultas (Cui *et al.* 2003). En otro estudio se reportó que las células de Schwann tratadas con ácido valproico mostraron un incremento directo en la proliferación celular en 24, 36 y 48 h (Fei *et al.* 2011).

El ácido valproico influencia a las células progenitoras en el proceso de diferenciación, ya que un tratamiento con ácido valproico durante las etapas progenitoras resulta en una fuerte proliferación y una inducción a la diferenciación neuronal, acompañada por aumento en la expresión de factores de transcripción proneural y un aumento en el número de células (Tag *et al.* 2009).

### **1.3 JUSTIFICACION**

Son muchas las funciones del cuerpo humano que son controladas a través del nervio periférico, por lo cual, cuando se sufren heridas traumáticas, enfermedades nerviosas, o ausencia de tejido nervioso en determinadas zonas del organismo, las consecuencias pueden ser graves, incluso se puede ver reducida la calidad de vida de los pacientes

En México, se llevó a cabo un estudio con el fin de conocer la prevalencia de secciones traumáticas de nervios periféricos en mano, en pacientes de la clínica de mano del Hospital General de Zona 89 del Instituto Mexicano de Seguro Social localizado en Guadalajara Jalisco, (Chavez Delgado *et al.* 2001). En este estudio, se evaluaron 976 pacientes, de los cuales el 75.4% eran del género masculino; en total se registraron 57 secciones de nervios periféricos con lo que se obtuvo una prevalencia del 5.8%, de las cuales el 98% sucedió en el centro de trabajo de los pacientes. Las lesiones por agentes cortantes sucedieron en 44%, por aplastamiento en 35%, por amputaciones en 21%, donde la mayoría se asoció con fracturas. Los nervios digitales fueron los más afectados (63%), y los nervios mediano, cubital y radial fueron afectados en 37% de los casos. Con esto se demuestra que la prevalencia de los daños en nervios periféricos es elevada. Dado que la clínica de la mano, en la cual se realizó el estudio, brinda un servicio de concentración de patología especializada se esperaría una prevalencia más elevada aún. El acelerado crecimiento de la población femenina trabajadora, la falta de concientización sobre el problema y la falta de campañas de prevención, son factores que pueden aumentar la incidencia en las lesiones en nervios periféricos en México. Sin embargo, este estudio es una clara muestra de la elevada epidemiología de lesiones en nervios periféricos en nuestro país.

Considerando que la matriz extracelular natural que cubre las células nerviosas proporciona un ambiente ideal con características topográficas, eléctricas y químicas específicas para la adhesión y proliferación de células neurológicas, pero

que, cuando ésta sufre algún daño como las mencionadas anteriormente, existe la necesidad de diseñar y fabricar un andamio que sea biocompatible, inerte inmunológicamente, biodegradable, resistente a infecciones y que se aproxime a la micro- y macroestructura de los nervios periféricos, para así favorecer el crecimiento de tejido nervioso. (Anuradha Subramanian *et al.* 2009)

Actualmente, no existe un andamio con estas características, por lo tanto, es conveniente fabricar un conducto que cumpla con estas condiciones el cual podría utilizarse no sólo para la regeneración de nervios, sino también para el tratamiento de defectos en otros tejidos nerviosos. Por lo tanto, este trabajo de investigación proporcionará conocimientos en el ámbito de la ingeniería de tejidos del sistema nervioso, así como materiales alternativos para el tratamiento de enfermedades del SNP. En este trabajo se utilizará el PGS, el cual es un material recientemente preparado que puede ser modificado, buscando mejorar sus propiedades que lo hagan un buen candidato para su aplicación en ingeniería de tejidos nerviosos. Asimismo, con esta propuesta se busca establecer un método reproducible para la producción de andamios a base de poli(glicerol sebacato) modificado con ácido valproico, una vez que han sido caracterizados fisicoquímica y mecánicamente. Finalmente, los resultados obtenidos podrán ser utilizados como una referencia en trabajos posteriores sobre regeneración de nervios.

#### **1.4 HIPOTESIS**

El poli(glicerol sebacato) puede ser modificado con valproato de sodio sin un cambio sustancial en sus propiedades y tener un uso potencial en la fabricación de guías para regeneración nerviosa.

## **1.5 OBJETIVOS**

### **1.5.1 Objetivo general.**

Sintetizar y caracterizar un elastómero a base de poli(glicerol sebacato) modificado con valproato de sodio con uso potencial en regeneración de nervios periféricos.

### **1.5.2 Objetivos específicos.**

- Sintetizar poli(glicerol sebacato), PGS, utilizando distintas condiciones en la síntesis y de entrecruzamiento.
- Caracterizar fisicoquímica (FTIR, DSC, DMA, TGA, DRX) y mecánicamente el PGS.
- Estudiar la degradación acelerada y bajo condiciones fisiológicas del PGS.
- Modificar el PGS con valproato por incorporación durante su hinchamiento en un disolvente.
- Caracterizar el nuevo material, PGS + valproato de sodio, mediante estudios fisicoquímicos y biológicos.

## CAPITULO 2 MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Síntesis del PGS

El poli(glicerol sebacato) fue sintetizado en masa siguiendo el procedimiento reportado por Wang *et al.* (2002). Para la síntesis del PGS una mezcla equimolar de glicerol y ácido sebácico se colocaron en una caja de Petri y se calentó en una estufa a 120°C durante 24 h. El prepolímero obtenido en forma de un líquido viscoso, fue calentado nuevamente a diferentes temperaturas (110°C, 120°C y 140°C) y presión reducida de -20 kPa durante 48 horas. En la figura 2.1 podemos ver un esquema de la síntesis y del material entrecruzado:

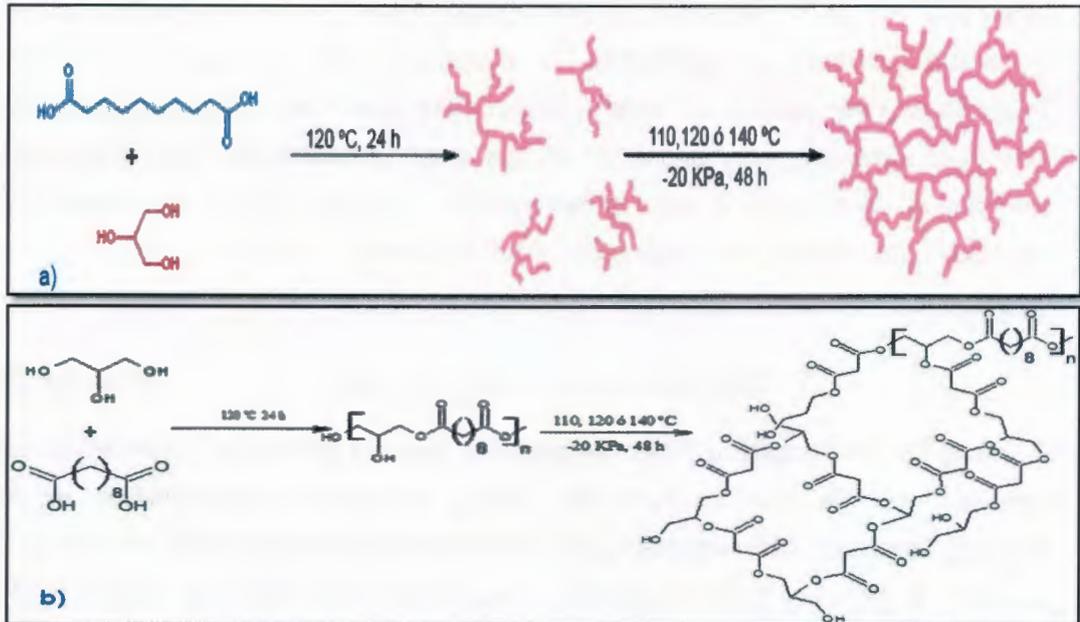


Figura 2. 1 Síntesis del poli(glicerol sebacato), a) representación esquemática, b) estructura química esperada.

### 2.2 Medición de la densidad

La determinación de la densidad de las muestras de PGS sintetizado, se llevó a cabo mediante el principio de Arquímedes. Para este fin se midió la masa en el aire de la muestra ( $m_c$ ) y posteriormente se determinó su masa en agua ( $m_e$ ). La densidad se determinó a temperatura ambiente (25°C) según la ecuación (1):

$$\rho_c = \frac{m_c}{m_e} \rho_a \quad \text{Ecuación (1)}$$

Donde  $\rho_c$  es la densidad del material, y  $\rho_a$  es la densidad del agua.

### 2.3 Medición del porcentaje de hinchamiento y densidad de entrecruzamiento.

El grado de hinchamiento fue determinado en muestras de PGS entrecruzado a diferentes temperaturas mediante una técnica gravimétrica. Las muestras fueron inicialmente pesadas para obtener la masa inicial ( $m_i$ ) y posteriormente, las muestras fueron sumergidas en THF durante 24 horas. Este disolvente fue elegido debido a que el porcentaje de hinchamiento es utilizado posteriormente para la determinación de la densidad de entrecruzamiento, y en la literatura ya se encuentra reportado un parámetro de interacción para el sistema PGS-THF. Después de este periodo de tiempo, las muestras fueron retiradas y el exceso de THF fue eliminado con papel, y se les pesó nuevamente, ( $m_s$ ). Todas las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (25°C) en recipientes cerrados para evitar la evaporación del disolvente durante el proceso. La determinación del porcentaje de hinchamiento se obtuvo mediante la ecuación (2):

$$\% \text{ hinchamiento} = \left( \frac{m_s - m_i}{m_i} \right) * 100 \quad \text{Ecuación (2)}$$

El contenido de fracción soluble (prepolímero que no reacciona) y contenido de fracción insoluble (red entrecruzada) fueron igualmente determinados en la muestra. Para esto, las muestras fueron secadas en una estufa a 100 °C durante 1 semana, al retirarlas fueron pesadas nuevamente para obtener el contenido de fracción insoluble  $m_f$ . El porcentaje de contenido de fracción soluble en la muestra se determinó mediante la siguiente ecuación (3):

$$\% \text{ Sol} = \left( \frac{m_i - m_f}{m_i} \right) * 100 \quad \text{Ecuación (3)}$$

La densidad de entrecruzamiento fue determinada por dos métodos distintos: por la teoría de hinchamiento de Flory-Rehner y mediante un método mecánico.

La teoría de Flory-Rehner involucra las mediciones ya mencionadas de hinchamiento y las relaciona con el número de cadenas activas en la red entrecruzada por unidad de volumen según las ecuaciones (4) y (5):

$$n = \frac{-[\ln(1-v_2)+v_2+\chi_1v_2]}{v_1[v_2^{1/3}-\frac{v_2}{2}]} \quad \text{Ecuación (4)}$$

Y:

$$v_2 = \left[1 + \left(\frac{m_s - m_i}{m_i}\right) \left(\frac{\rho_2}{\rho_1}\right)\right]^{-1} \quad \text{Ecuación (5)}$$

Donde:

$n$  = Número de segmentos de cadena activos en la red.

$v_2$  = Fracción volumétrica del polímero en la masa hinchada.

$V_1$  = Volumen molar del disolvente.

$\chi_1$  = Parámetro de interacción polímero-disolvente = 0.42 (Chen *et. al* 2008).

$\rho_1$  = Densidad del polímero.

$\rho_2$  = Densidad del disolvente.

$m_s$  = Masa con disolvente.

$m_i$  = Masa inicial.

El segundo método, el método mecánico, relaciona el módulo de Young obtenido de los ensayos mecánicos de tensión con la densidad de entrecruzamiento ( $n$ ) del material por medio de la siguiente ecuación:

$$n = \frac{E}{3RT} \quad \text{Ecuación (6)}$$

Donde:

$n$  = Número de segmentos de cadena activos en la red.

$E$ = Módulo de Young

$R$ = Constante universal de los gases

$T$ = Temperatura absoluta

Además de las medidas anteriores, se determinó la distancia de cadenas entre puntos de entrecruzamiento por medio de la siguiente ecuación:

$$M_c = \frac{\rho}{n} \quad \text{Ecuación (7)}$$

Donde:

$M_c$ = Peso molecular entre puntos de entrecruzamiento.

$n$ = Número de segmentos de cadena activos en la red.

$\rho$ = Densidad del polímero.

Este parámetro se calculó tanto con los valores de  $n$  obtenidos por el método de hinchamiento como con los obtenidos por el método mecánico

## 2.4 Hidrofilicidad y absorción de agua

La hidrofilicidad del polímero se determinó mediante la medición de su ángulo de contacto en agua. Esta medición ( $n=10$ ) se realizó depositando una gota de 5  $\mu\text{L}$  de agua destilada sobre PGS obtenido a 110, 120 y 140  $^{\circ}\text{C}$ , y midiendo el ángulo de contacto después de 10 s de haber colocado la gota en la superficie del material.

La cantidad de agua que es capaz de absorber el material fue determinada siguiendo un procedimiento similar al utilizado para determinar el hinchamiento en THF. En este caso, las probetas del material fueron remojadas en agua destilada durante 24 h y se determinó el porcentaje de absorción según la ecuación:

$$\% \text{ absorción} = \left( \frac{m_a - m_i}{m_a} \right) * 100 \quad \text{Ecuación (8)}$$

Donde:

$m_a$  = masa de la muestra más agua absorbida.

$m_i$  = masa inicial de la muestra.

## **2.5 Caracterización.**

### **2.5.1 Caracterización espectroscópica (FTIR)**

Para obtener los espectros de infrarrojo, se corrieron las muestras mediante la técnica de reflectancia total atenuada (ATR por sus siglas en inglés). Las muestras se corrieron en el intervalo espectral de 4000–600  $\text{cm}^{-1}$ , con resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ , y 100 barridos empleando un espectrofotómetro con transformada de Fourier de Thermoscientific. Se corrieron muestras tanto del prepolímero como de los materiales entrecruzados con las diferentes variables.

### **2.5.2 Caracterización térmica (DSC, TGA, DMA)**

La temperatura de fusión ( $T_m$ ) de las muestras, tanto del prepolímero de PGS como del material entrecruzado, se obtuvo en un equipo DSC-7 de Perkin Elmer. Para esto, se utilizaron de 5 a 7 mg de muestra y se registró el primer y el segundo calentamiento. Antes del primer calentamiento, se registró el enfriamiento desde 25 hasta  $-40$   $^{\circ}\text{C}$ , se calentó hasta 180  $^{\circ}\text{C}$ ; posteriormente se enfrió la muestra sin una velocidad controlada debido a que este paso del análisis no se registró; la segunda corrida se realizó desde 25 hasta 180  $^{\circ}\text{C}$ . Todas las corridas se llevaron a cabo con una rampa de calentamiento de 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y en atmósfera de nitrógeno.

La temperatura de descomposición se obtuvo mediante análisis termogravimétrico (TGA). Las muestras se calentaron desde 50 hasta 650  $^{\circ}\text{C}$  con una rampa de calentamiento de 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  bajo atmósfera de nitrógeno. La temperatura de

descomposición ( $T_d$ ) se reporta como el pico después de obtener la derivada de la curva de masa perdida vs. temperatura.

La  $T_g$  se determinó mediante análisis mecánico dinámico (DMA). Los ensayos de DMA se realizaron con un equipo Perkin-Elmer modelo DMA-7 en modo de extensión con probetas rectangulares de 20 mm de longitud, 5 mm de ancho y espesor menor a 1 mm. Las muestras se analizaron en un intervalo de temperatura desde -100 hasta 30 °C, a una frecuencia de 1 Hz y una rampa de calentamiento de 5 °C/min. El intervalo de temperatura al cual se llevaron a cabo las corridas se determinó de acuerdo a un reporte previo (Jaafar *et al.* 2010). La  $T_g$  se reporta como la inflexión en el módulo de almacenamiento y como el pico de la curva  $\tan \delta$  vs. temperatura.

### **2.5.3 Caracterización estructural (DRX)**

Muestras de 1 cm<sup>2</sup> tomadas de los polímeros entrecruzados se analizaron en un difractómetro Siemens D5000 con radiación  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1.5416 \text{ \AA}$ ) con un paso de 0.04°, un tiempo de paso de 6 segundos en el intervalo de  $2\theta$  de 5 a 60°, con 34 kV y 25 mA.

## **2.6 Caracterización mecánica**

### **2.6.1 Ensayos mecánicos a tensión**

Las pruebas a tensión se llevaron a cabo en una máquina de pruebas mini Shimadzu utilizando una velocidad de cabezal de 10 mm/min y una celda de carga de 1000 N. Los especímenes fueron cortados en probetas rectangulares con dimensiones de 25 mm x 5 mm x t (largo x ancho x espesor,  $t < 1\text{mm}$ ) según la norma BS EN ISO 527:31996. Se ensayaron muestras del PGS almacenadas en un desecador durante una semana después de su síntesis mientras que otro grupo de probetas del material, se acondicionó en agua destilada a 37 °C durante 24 horas. Con estos ensayos se determinó el porcentaje de deformación ( $\epsilon$ ), el esfuerzo máximo ( $\sigma$ ) y el módulo elástico calculado como la pendiente de la gráfica entre 0 y 0.1N de carga.

### **2.6.2 Ensayos mecánicos a compresión.**

Las pruebas mecánicas a compresión se realizaron en una máquina de pruebas mini Shimadzu, con una velocidad de cabezal de 10 mm/min y una celda de carga de 1000 N. Los especímenes fueron cortados en forma cilíndrica de placas de PGS, previamente moldeadas en cajas de Petri, cada probeta con dimensiones de 8 mm x 17 mm (altura x diámetro) según la norma ASTM D 575-91. La prueba se realizó únicamente con el material curado a 120 °C, condición que fue elegida para la modificación con valproato y posteriormente para las pruebas biológicas.

## **2.7 Estudios de Degradación**

### **2.7.1 Estudios de degradación acelerada**

La degradación acelerada (hidrolítica, oxidante, fisiológica) se llevó a cabo por reflujo a 100 °C por 24 h en soluciones de HCl 2M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, NaClO al 6% (Cloralex ®) y agua destilada como control. Para estos análisis se utilizaron entre 0.11g y 0.2g de muestra en 75 ml de cada solución. Los residuos de la degradación fueron lavados y secados a 60 °C y presión reducida. Con los resultados se calcularon los porcentajes de pérdida de masa. Estos estudios fueron realizados a todas las muestras entrecruzadas.

### **2.7.2 Degradación en PBS**

Para la degradación en solución amortiguadora de fosfatos (PBS por su abreviación en inglés) se cortaron y se pesaron muestras de aproximadamente 150 mg del PGS curado ( $m_i$ ), y después fueron introducidas en viales con PBS y puestas en condiciones de 37 °C a un pH de 7.4. El PBS fue cambiado cada semana para mantener dicho pH y se tomaron muestras cada 7 días hasta por 21 días. Al retirarlos del vial las muestras fueron pesadas nuevamente, para determinar el grado de absorción de PBS, posteriormente fueron lavadas y secadas a 60°C y presión reducida. Con los resultados se calcularon los

porcentajes de pérdida de masa. Estos estudios fueron realizados a todas las muestras entrecruzadas.

## **2.6 Modificación con valproato.**

### **2.6.1 Síntesis de PGS + valproato.**

Para la obtención del PGS modificado con valproato de sodio, la síntesis se realizó en las mismas condiciones que el prepolímero de PGS (120 °C, 24 horas) pero en este caso, el prepolímero fue mezclado con tres diferentes concentraciones de valproato, esto es, 5, 10 y 15% de valproato con respecto al peso final de la muestra. La mezcla entre el prepolímero de PGS y el valproato se llevó a cabo con THF como disolvente y fue agitada hasta la completa disolución de ambos componentes. Esta mezcla fue vertida en moldes de vidrio planos para su posterior entrecruzamiento, antes del cual se dejó evaporar el THF durante cuatro días. Después de este tiempo, se colocaron los moldes con la muestra en una estufa a 120 °C por 48 horas y una presión reducida de -20 kPa.

### **2.6.2 Caracterización espectroscópica (FTIR)**

Los espectros de infrarrojo fueron obtenidos mediante la técnica de reflectancia total atenuada (ATR por sus siglas en inglés) utilizando las mismas condiciones que las de las muestras de PGS puro.

### **2.6.3 Caracterización térmica (DSC)**

La temperatura de fusión ( $T_m$ ) de las muestras modificadas con los distintos porcentajes de valproato, se determinó con un equipo DSC-7 de Perkin Elmer. Para esto, se utilizaron de 5 a 7 mg de muestra y se registró el primer y el segundo calentamiento. Antes del primer calentamiento, se enfrió desde 25 hasta -60 °C y después se calentó hasta 150 °C. Todas las corridas se llevaron a cabo con una rampa de calentamiento de 10 °C/min en atmósfera de nitrógeno.

#### **2.6.4 Caracterización Mecánica**

Las pruebas mecánicas de los materiales modificados, se realizaron únicamente mediante ensayos a tensión en una máquina de pruebas mini Shimadzu a una velocidad de cabezal de 10 mm/min con una celda de carga de 1000 N. Los especímenes fueron cortados en probetas rectangulares con dimensiones de 25 mm x 5 mm x t (largo x ancho x espesor,  $t < 1\text{mm}$ ) según la norma BS EN ISO 527:31996. Se ensayaron muestras del PGS modificado almacenadas en un desecador 1 semana después de su síntesis. Con estos ensayos se determinó el porcentaje de deformación ( $\epsilon$ ), el esfuerzo máximo ( $\sigma$ ) y el módulo elástico calculado como la pendiente de la gráfica entre 0 y 0.1N de carga.

#### **2.7 Pruebas biológicas.**

##### **2.7.1 Viabilidad de linfocitos en presencia de PGS**

Los análisis de supervivencia celular se llevaron a cabo para el PGS y el PGS modificado con los diferentes porcentajes de valproato, así como en un lote testigo, mediante un ensayo colorimétrico, que se basa en la reducción de una sal demetiltetrazolio MTT a formazán, gracias a la actividad metabólica de las enzimas deshidrogenasas, que se encuentran en la mitocondria de células activas, por lo que la reacción ocurre solo en células vivas.

Para dichos análisis, las células fueron obtenidas de sangre periférica humana mediante punción venosa en el brazo con una jeringa con heparina, la sangre fue colocada en tubos de centrifugado con 2.5 ml de medio de cultivo McCoy 5a modificado de la marca Microlab, a los cultivos se les añadió fitohemaglutinina (agente mitogénico), heparina (anticoagulante) y antibiótico, todos de la misma marca.

Para la expansión celular, se colocaron a 37 °C durante 24 h en una estufa sin condiciones controladas de humedad y CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las células fueron

expuestas a los diferentes materiales durante 48 horas. Al final de este periodo, los medios de cultivo que contenían las células no adheridas fueron retirados de la estufa y centrifugados a 1500 rpm durante 10 min y se tomaron alícuotas de 75  $\mu$ l de la capa de linfocitos, aunque es común, que por la técnica para tomar la alícuota se filtren en ella eritrocitos.

Con el fin de eliminar los eritrocitos que interfieren en la lectura de la densidad óptica, a cada alícuota se agregaron 5 ml de una solución amortiguadora de lisis de eritrocitos (4.496g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.5g  $\text{KHCO}_3$ , 18.5mg EDTA, pH = 7.3)-agua destilada (1:10). Posteriormente, las muestras fueron colocadas en la oscuridad durante aproximadamente 15 min, al retirarlas se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min y se decantaron. Posteriormente se les aplicó un tratamiento con una solución hipotónica de KCl al 0.4%-agua destilada (1:10); para ello, a cada muestra se agregaron 5 ml de dicha solución y se colocaron en la estufa a 37 °C durante 10 min, y después fueron centrifugadas nuevamente a 2000 rpm por 10 min para después decantarlas. Finalmente, se les dio un tratamiento, similar al proporcionado con la solución hipotónica, pero esta vez sólo con agua destilada, y se les agregaron 50  $\mu$ l de una solución de MTT para dejarlas durante 2.5 h en la estufa a 37 °C. Al retirarlas se les agregaron 50  $\mu$ l de isopropanol, se dejaron 10 min más en la estufa, para posteriormente llevar a cabo la lectura en un Lector de placas de ELISA marca LabSystems Multiskan MS a una longitud de onda de 595nm, tomando como referencia el MTT sin haberlo expuesto a la actividad celular, con esto se obtuvo la densidad óptica (DO) de cada muestra la cual se relaciona de manera lineal con el número de células activas.

Los datos obtenidos de estas pruebas se analizaron por ANOVA (one-way analysis of variance) y con una prueba de tipo Tukey para analizar la diferencia estadística.

## **CAPITULO 3 DISCUSION Y RESULTADOS.**

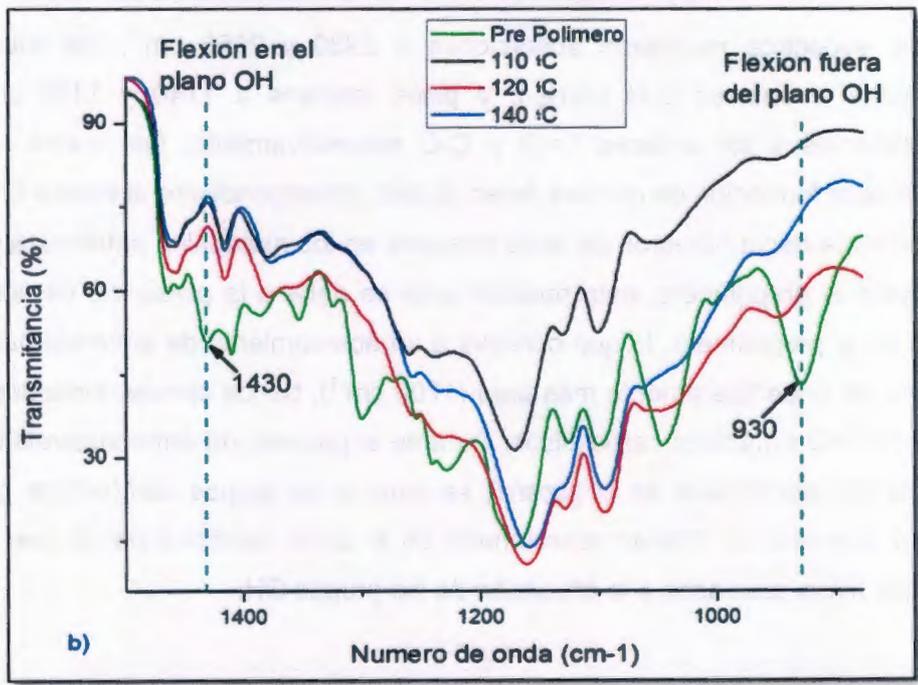
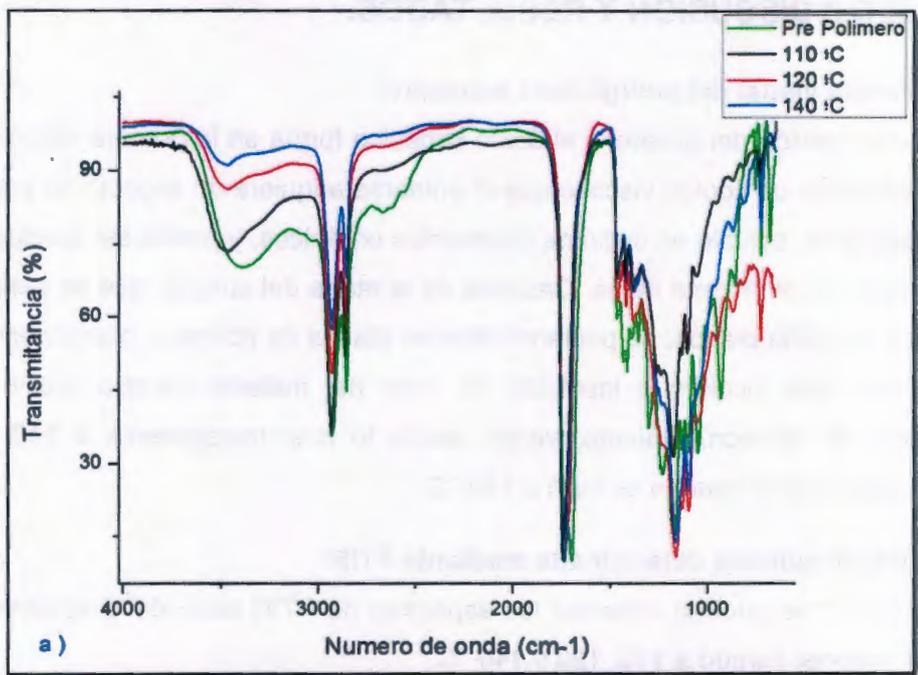
### **3.1 Apariencia visual del poli(glicerol sebacato)**

La policondensación del glicerol y el ácido sebácico forma en la primera etapa de prepolimerización un líquido viscoso que al enfriarse adquiere un aspecto de pasta blanca, pegajosa, soluble en distintos disolventes orgánicos, y puede ser fundido a temperaturas relativamente bajas. Después de la etapa del curado, que se realizó en moldes de vidrio planos, se pudieron obtener placas de polímero elastomérico, transparente, casi incoloro e insoluble. El color del material variaba según la temperatura de entrecruzamiento, yendo desde lo más transparente a 110 °C hasta un color ámbar cuando se curó a 140 °C.

### **3.2 Estructura química determinada mediante FTIR**

En la figura 3.1 se pueden observar los espectros de FTIR tanto del prepolímero como del material curado a 110, 120 y 140 °C.

Todos los espectros mostraron absorciones a 2930 y 2855  $\text{cm}^{-1}$ , las cuales corresponden a enlaces C-H ( $-\text{CH}_2-$ ), y picos intensos a 1740 y 1164  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a los enlaces C=O y C-O respectivamente, los cuales son evidencia de la formación de enlaces éster. El pico correspondiente al enlace C=O parece correrse hacia números de onda mayores en los materiales entrecruzados con respecto al prepolímero, esto posiblemente se debe a la presencia de ácido sebácico en el prepolímero, lo que conlleva a un acercamiento de la banda hacia un número de onda ligeramente más bajo (1700  $\text{cm}^{-1}$ ), banda correspondientes a los enlaces C=O en ácidos carboxílicos. Durante el proceso de entrecruzamiento, los grupos OH adicionales en el glicerol, se unen a los grupos carboxílicos que hasta ese momento no habían reaccionado en el ácido sebácico por lo que se reducen los picos asociados a la absorción de los grupos OH.



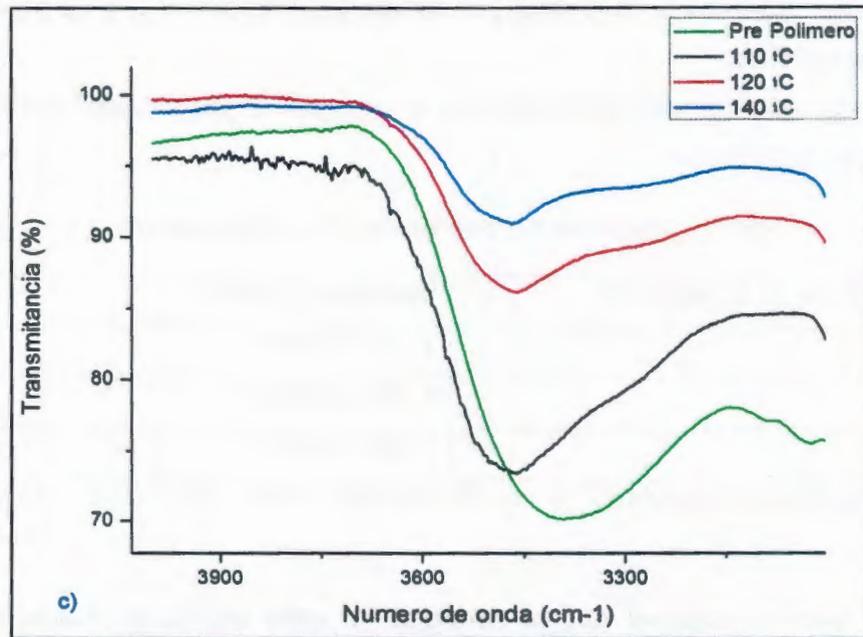


Figura 3.1 Espectros FTIR del prepolímero y de las muestras curadas a 110, 120 y 140 °C a) espectro completo, b) región de 1500 a 900 cm<sup>-1</sup>, c) región de 4000 a 3000 cm<sup>-1</sup>.

También, se pudo observar una reducción en los picos localizados a 1430 cm<sup>-1</sup> y 930 cm<sup>-1</sup> característicos de la flexión en el plano y fuera del plano respectivamente, propios del enlace O-H en el ácido carboxílico (ver figura 3.1b), lo que significa que según avanza el tiempo de curado los ácidos reaccionan con los alcoholes en la mezcla para formar los enlaces éster. Además, se observó la reducción gradual con la temperatura en el pico localizado aproximadamente a 3500 cm<sup>-1</sup>, característico del estiramiento de los enlaces OH en un ambiente de puente de hidrógeno (ver figura 3.1c), lo cual implica que los grupos hidroxilo son consumidos para formar los entrecruzamientos al formar ésteres.

### 3.3 Determinación de la densidad, porcentaje de hinchamiento y densidad de entrecruzamiento.

Los valores de la densidad medida por el principio de Arquímedes se pueden observar en la tabla 3.1.

Tabla 3.1 Densidad del PGS entrecruzado a diferentes temperaturas.

Temperatura de curado (°C)	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )
110	1.126 ± 0.005
120	1.129 ± 0.002
140	1.129 ± 0.005

n=3, ± desviación estándar. 110 vs 120 p>0.05; 110 vs 140 p>0.05; 120 vs 140 p>0.05.

En esta tabla se observa que la densidad no varía significativamente con la diferencia de condiciones de entrecruzamiento, aunque sí se observa que presenta una tendencia a aumentar, según aumenta la temperatura de curado. Este resultado concuerda con un trabajo previo (Chen *et al.* 2008) en el que se encontro que la densidad aumenta segun se aumenta la temperatura de curado aunque sin llegar a ser un cambio significativo.

El porcentaje de hinchamiento fue medido en THF, al igual que el contenido de fracción soluble, y los resultados se presentan a continuación en la Tabla 3.2:

Tabla 3.2 Propiedades de hinchamiento en THF de PGS entrecruzado a diferentes temperaturas.

Temperatura de curado (°C)	Hinchamiento (%)	Contenido de fracción soluble (%)
110	524±71	45.7 ± 4.5
120	280 ±14	27.7 ± 3.6
140	185 ±63	6.4 ± 0.9

n=3, ± desviación estándar.; 110 vs 120 p<0.001; 110 vs 140 p < 0.000; 120 vs 140 p>0.05.

Los datos anteriores muestran que la temperatura de curado es un factor clave en la densidad de entrecruzamiento del material. El porcentaje de hinchamiento decrece cuando se aumenta la temperatura de entrecruzamiento, debido a que el PGS forma una red más entrecruzada. El grado de entrecruzamiento determina el espacio que hay entre cadenas del material, que es donde se aloja el disolvente absorbido; es decir, al estar menos entrecruzado el espacio entre cadenas es más grande y más disolvente puede penetrar. En materiales altamente entrecruzados la mayoría de los grupos pendientes de las cadenas en el prepolímero han reaccionado, dando como resultado puntos de entrecruzamiento más cercanos por lo que hay muy poco espacio donde se pueda alojar el disolvente, y como resultado, un material más entrecruzado absorbe menos disolvente. En la Figura 3.2 se puede ver un esquema donde se ilustra el entrecruzamiento del PGS a 120 °C y 140 °C.

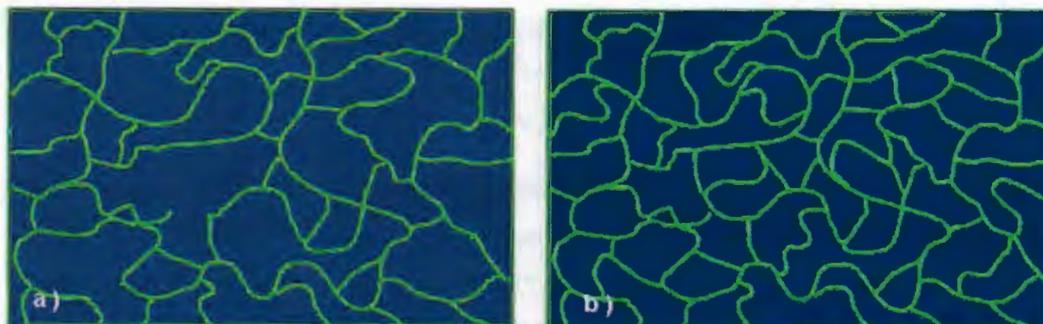


Figura 3.2 Red tetraédrica molecular sugerida del PGS entrecruzamiento a) a 120 °C y b) a 140 °C.

De la misma manera que el porcentaje de hinchamiento, el porcentaje de contenido de fracción soluble disminuyó con la temperatura de entrecruzamiento, lo cual demuestra que cuando el material se cura a mayores temperaturas queda un menor número de cadenas de prepolímero sin reaccionar, las cuales aún pueden ser disueltas por el disolvente. El contenido de fracción insoluble determina la cantidad de material que reacciona en la etapa de entrecruzamiento y es el porcentaje de red entrecruzada, el cual es el restante al porcentaje de fracción insoluble. Se puede observar que el material curado a 140 °C está

entrecruzado en un 96%, mostrando una gran diferencia con los materiales curados a menores temperaturas.

Los resultados de la densidad de entrecruzamiento así como de la distancia entre cadenas medida por dos métodos se pueden observar en la tabla 3.3.

Tabla 3.3 Determinación del grado de entrecruzamiento obtenido por el método de Flory-Rehner y por el método mecánico.

Temperatura de curado	Método de hinchamiento		Método mecánico	
	Densidad de entrecruzamiento (mol/cm <sup>3</sup> )	Mc (g/mol)	Densidad de entrecruzamiento (mol/cm <sup>3</sup> )	Mc (g/mol)
110 °C	1.6 (10 <sup>-4</sup> ) ± 3 (10 <sup>-5</sup> )	7.1 (10 <sup>3</sup> ) ± 1.3 (10 <sup>3</sup> )	6.6 (10 <sup>-5</sup> ) ± 1.3 (10 <sup>-5</sup> )	1.7 (10 <sup>4</sup> ) ± 3.8 (10 <sup>3</sup> )
120 °C	4.9 (10 <sup>-4</sup> ) ± 4.8 (10 <sup>-5</sup> )	2.3 (10 <sup>3</sup> ) ± 2.5 (10 <sup>2</sup> )	2.1 (10 <sup>-4</sup> ) ± 1.3 (10 <sup>-5</sup> )	5.3 (10 <sup>3</sup> ) ± 3.3 (10 <sup>2</sup> )
140 °C	1.2 (10 <sup>-3</sup> ) ± 6.8 (10 <sup>-4</sup> )	1.1 (10 <sup>3</sup> ) ± 6.4 (10 <sup>2</sup> )	3.1 (10 <sup>-4</sup> ) ± 1.8 (10 <sup>-5</sup> )	3.6 (10 <sup>3</sup> ) ± 2.2 (10 <sup>2</sup> )

n=3, ± desviación estándar. Mc = distancia entre puntos de entrecruzamiento.

Para la medición del grado de entrecruzamiento por medio del método de Flory-Rehner se utilizó un parámetro de interacción polímero-disolvente, reportado por Chen *et al.* (2008) para el sistema PGS-THF,  $\chi_1 = 0.42$ . La fracción volumétrica de polímero en la masa hinchada,  $v_2$  se midió a través de las masas de las mismas muestras utilizadas para la determinación del porcentaje de hinchamiento del PGS. Para la medición por el método mecánico se utilizó el módulo de Young obtenido mediante los ensayos mecánicos de tensión. En la tabla 3.3 podemos ver que en relación con la medición anterior del porcentaje de fracción soluble, la densidad de entrecruzamiento claramente aumenta con la temperatura a la cual es curado el material. De la misma manera se observa que para la densidad medida a través de las pruebas mecánicas los valores obtenidos son un poco menores con respecto a los obtenidos por la teoría de Flory-Rehner.

Se esperaba que al utilizar el módulo de Young para calcular la densidad de entrecruzamiento se obtuvieran valores más altos que los obtenidos por la teoría de hinchamiento, debido a que en el método mecánico se toman en cuenta, además del entrecruzamiento químico, los entrecruzamientos físicos que pudieran darse (Sperling 2006). Sin embargo, los resultados obtenidos se encuentran en concordancia con el estudio realizado por Chen *et al.* en 2008, en el cual los resultados obtenidos por el método de hinchamiento son ligeramente mayores que los obtenidos por pruebas mecánicas. Esto podría deberse a que el parámetro de interacción entre el PGS y el THF ( $\chi_1$ ), utilizado para el cálculo de la densidad de entrecruzamiento, por medio de la teoría de Flory-Rehner, es el que más se ajusta al comportamiento mecánico y no una constante como teóricamente se describe.

Como se puede observar en la figura 3.2, mientras más entrecruzado se encuentra un material presenta mayor número de puntos de entrecruzamiento, lo que da como resultado una menor distancia entre éstos puntos, debido a lo cual al aumentar la temperatura de curado la densidad de entrecruzamiento aumenta y la distancia entre puntos de entrecruzamiento ( $M_c$ ) tiende a decrecer.

### **3.4 Hidrofilicidad y absorción de agua**

Los ángulos de contacto obtenidos así como el porcentaje de absorción de agua se presentan en la tabla 3.4.

Tabla 3.4 Hidrofilicidad y absorción de agua de PGS entrecruzado a diferentes temperaturas.

Temperatura de curado (°C)	Angulo de contacto (grados)	Absorción de agua (%)
110	67 ±2	3.3 ±0.4
120	70 ±3	2.2 ±2
140	80 ±4	1.7±0.8

n=10, ± desviación estándar.

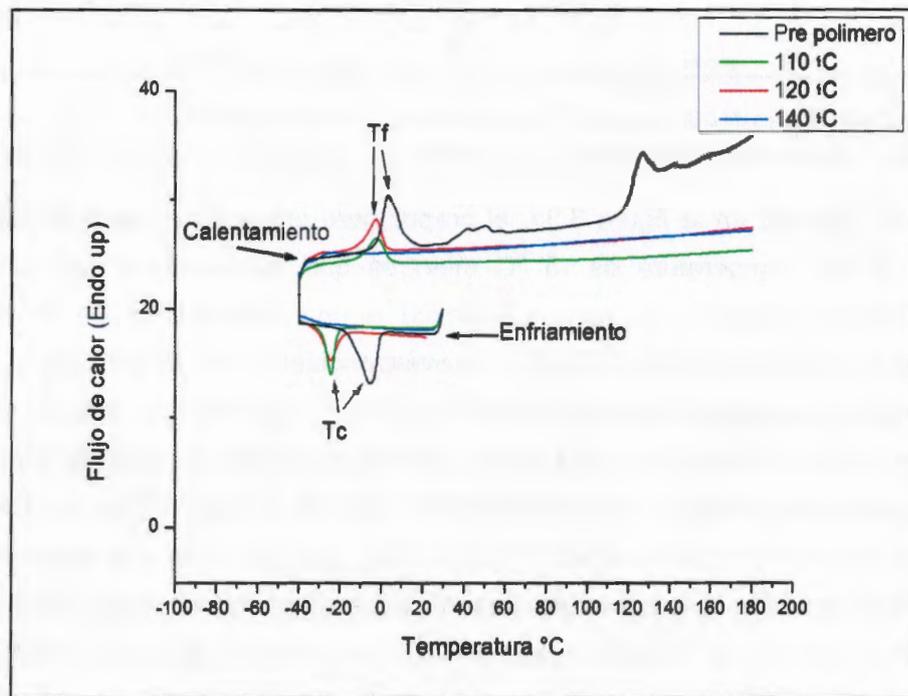
Como se puede observar el polímero es hidrofóbico y el ángulo de contacto en agua aumenta según se incrementa el grado de curado, ya que al aumentar el grado de entrecruzamiento se disminuye el número de OH libres en sus cadenas, lo cual resta hidrofilicidad al material. Los datos obtenidos no concuerdan con lo reportado (Wang *et al.* 2002), quien menciona un ángulo de contacto de 32°, éstos es debido a que como se demuestra en la sección de ensayos mecánicos los materiales obtenidos en este trabajo se encuentran más entrecruzados por lo cual poseen un menor número de grupos OH y COOH libres con respecto al de Wang, dando como resultado un aumento en el ángulo de contacto. Los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos en un estudio previo (Patel, *et al.* 2011), quien menciona un ángulo de contacto de 77.5° para el PGS.

En relación directa a la hidrofilia del PGS sintetizado también se pudo observar que la absorción de agua disminuyó conforme el PGS estaba más entrecruzado variando de un 3.4% hasta 1.8%. Se puede observar que el error en el porcentaje de absorción de agua en el material curado a 120 °C es muy grande, esto se debe a el método utilizado para su medición, en el cual, los materiales, después de ser remojados en agua destilada durante 24 h, se volvieron pegajosos por lo que se pudo perder masa al pesar las muestras.

### 3.5 Caracterización físico-química

#### 3.5.1 Comportamiento térmico mediante DSC

El análisis de calorimetría diferencial de barrido permitió conocer la temperatura de cristalización ( $T_c$ ) del PGS, durante el enfriamiento, así como la temperatura de fusión ( $T_m$ ) durante el calentamiento. En el termograma de la figura 3.3 se muestran los resultados de las dos corridas y un acercamiento durante el ciclo de enfriamiento y calentamiento entre  $-30$  y  $-40$  °C de las muestras curadas a  $120$  y  $140$  °C.



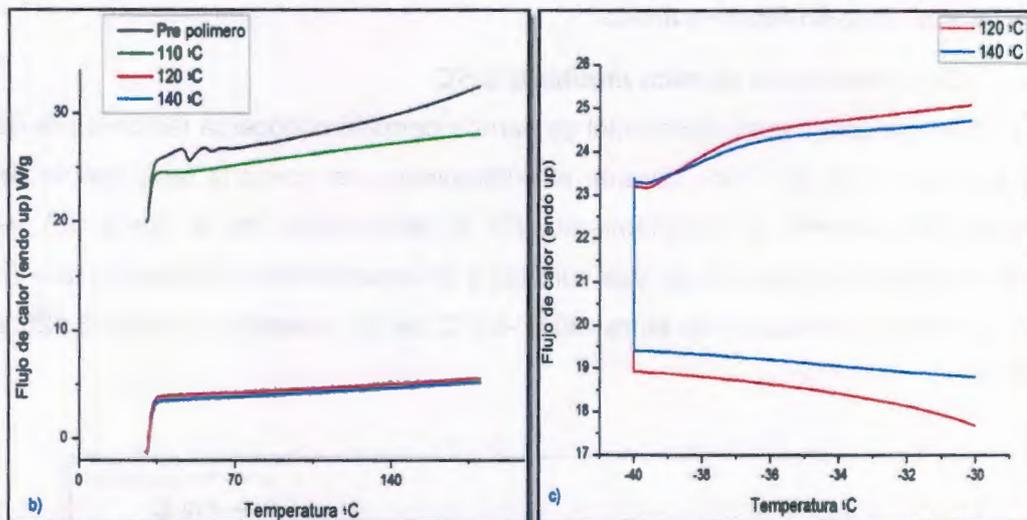


Figura 3.3 Termogramas de DSC a) corrida 1 enfriamiento de 25 a -40 °C y calentamiento de -40 a 180 °C, b) corrida 2 calentamiento de 25 a 180 °C, c) acercamiento a la región entre -30 y -40°C de la corrida 1.

Como se observa en la figura 3.3a, el prepolímero presenta un pico exotérmico amplio a una temperatura de -5 °C mientras que las muestras del material entrecruzado presentan un pico exotérmico a una temperatura de -24.5 °C, excepto la muestra curada a 140 °C, correspondiente a la cristalización. Esta temperatura es característica del material, ya que no pertenece a ninguna de las materias primas utilizadas en su síntesis. En efecto, el glicerol cristaliza sólo bajo condiciones específicas a aproximadamente -45 °C (Kalyan 2009) y el ácido sebáico se presenta como polvo cristalino. Este pico presenta una altura mayor conforme menor fue la temperatura de entrecruzamiento del material, y de hecho, se puede notar que el material curado a 140 °C no presenta dicho pico, indicando que se encuentra altamente entrecruzado. De la misma manera, el prepolímero presenta un pico endotérmico correspondiente a la temperatura de fusión a una temperatura de 3 °C, mientras que los materiales curados presentan el mismo pico endotérmico a -2 °C. El material entrecruzado a 140 °C no presentó este pico, lo cual concuerda con que no cristalizó. Estos picos exotérmicos y endotérmicos señalan que el PGS es un material semicristalino a bajas temperaturas, y la reducción en la altura de los picos demuestra que el grado de cristalización se

reduce según se aumenta la magnitud de entrecruzamiento. A mayores temperaturas de curado se da una reducción en el pico exotérmico lo cual demuestra que la movilidad de las cadenas es más baja y el material no es capaz de formar cristales, capacidad que se reduce con el aumento del grado de entrecruzamiento, requiriéndose mayor enfriamiento para cristalizarlo, hasta que la muestra muy entrecruzada ya no puede cristalizar. Estos resultados concuerdan con el trabajo previo realizado por Liu *et al* en 2007. Los picos endotérmicos en la primera corrida a aproximadamente 40 y 130 °C y exotérmicos a 50 °C en la segunda corrida, en el prepolímero son atribuibles a reacciones de entrecruzamiento, y estos picos no han sido reportados en otros estudios de DSC realizados a este material.

La figura 3.3b muestra que por encima de la temperatura ambiente el material ya no presenta transiciones, lo cual sugiere que el PGS es amorfo a una temperatura de 35 °C, esto quiere decir que después de la primera corrida, en la cual, el material sufre un enfriamiento (a -40 °C) y un calentamiento (a 180 °C), al enfriarse de nuevo hasta la temperatura ambiente el material no sufre ninguna transición por lo cual después de todos esos pasos en el análisis, el material continua siendo amorfo a temperaturas arriba de los 35 °C.

En la figura 3.3c, se observa que la Tg de las muestras curadas a 120 y 140 °C se presenta como un pequeño escalón entre las temperaturas de -30 y -40 °C lo cual concuerda con el estudio de Jaafar *et al.* (2010). La Tg no se alcanza a observar en este experimento tanto en el prepolímero como en el material curado a 110 °C, debido a que ésta transición se va desplazando hacia temperaturas mas altas según se aumenta el grado de curado (Turi *et al.* 1981), por lo cual es probable que la Tg de dichas muestras se encuentre por debajo de los -40 °C, mientras que las de los materiales más entrecruzados (curados a 120 y 140 °C) sí se observan por encima de los -40 °C porque es mayor su entrecruzamiento.

### 3.5.2 Comportamiento térmico mediante TGA

Mediante este análisis se pudo determinar la temperatura a la que el material se descompone en la gráfica de pérdida de peso vs. temperatura, lo cual se puede observar mejor cuando se grafica la derivada de la pérdida de peso como se muestra en la figura 3.4.

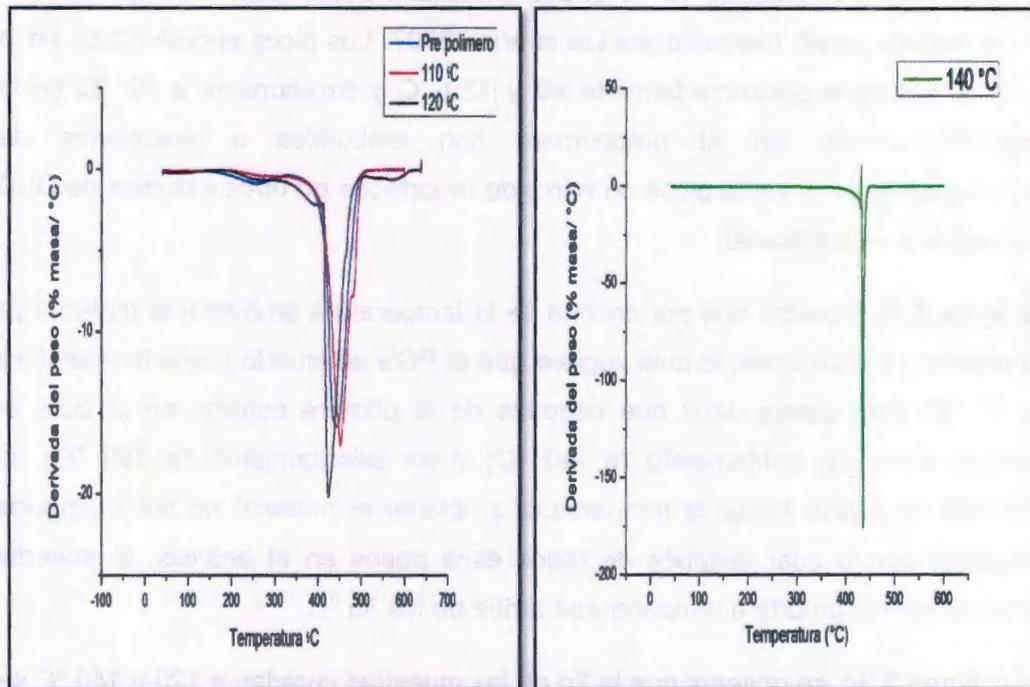


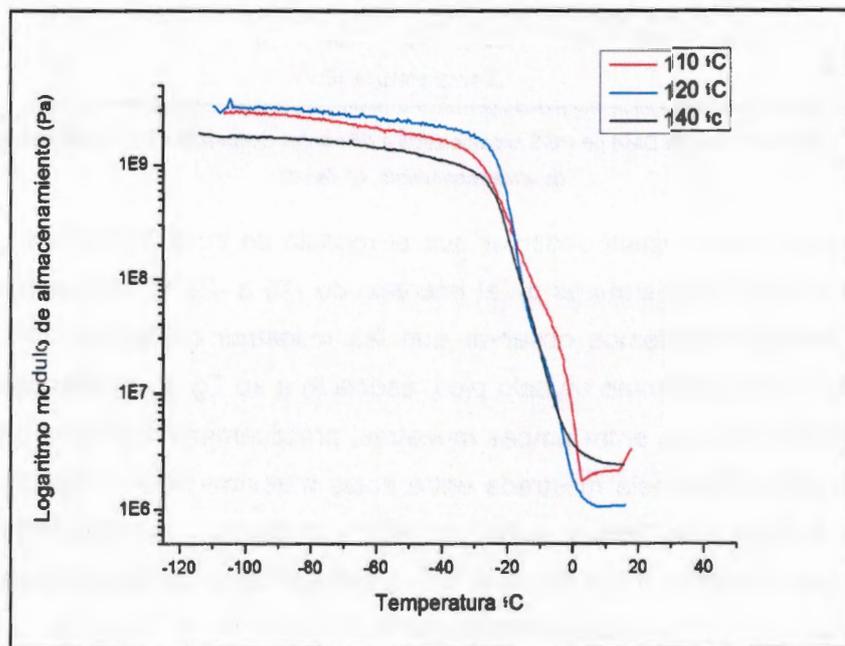
Figura 3.4 Gráfica de la derivada de la masa vs temperatura de PGS prepolímero y curado a diferentes temperaturas.

De las gráficas anteriores podemos ver que las temperaturas de descomposición se encuentran en 445 °C para el prepolímero, 451.7 °C para el material curado a 110 °C, 424.5 °C para el curado a 120 °C, y 435.5 °C para el curado a 140 °C. La transición a aproximadamente 430 °C que se presenta en la grafica del PGS curado a 140 °C, es atribuible a la parte de fracción soluble presente en el material, es decir, cadenas de prepolímero que no están unidas a la red entrecruzada. Inesperadamente el material curado a 120 °C presenta la

temperatura más baja de descomposición, incluso más baja que la del prepolímero.

### 3.5.3 Comportamiento térmico mediante DMA

A través del análisis dinámico mecánico (DMA por sus siglas en inglés) fue posible determinar las transiciones que presenta el PGS. Los resultados se pueden ver en la figura 3.5 donde se muestra el logaritmo del módulo de almacenamiento ( $E'$ ) y  $\text{Tan } \delta$  vs. la temperatura.



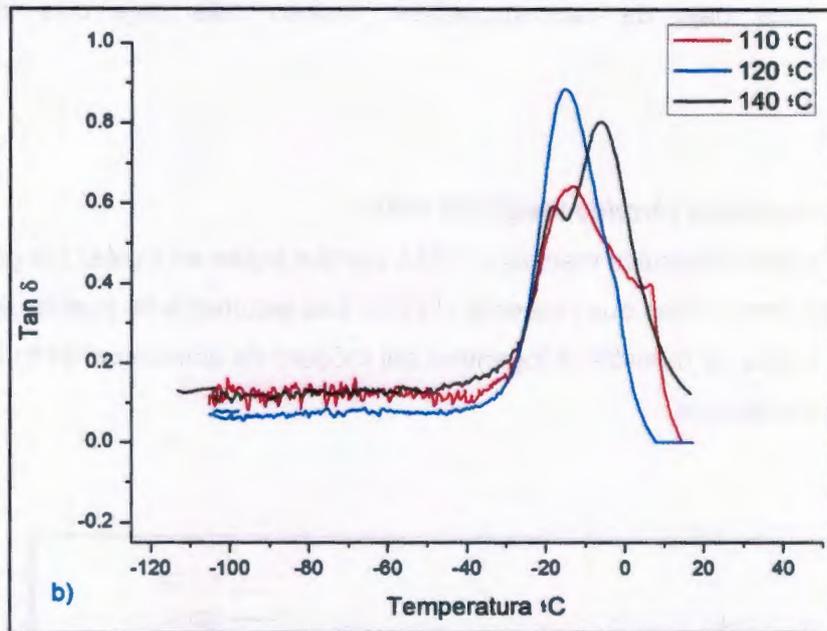


Figura 3.5 . Termogramas de DMA de PGS entrecruzado a diferentes temperaturas. a) Logaritmo del módulo de almacenamiento, b)  $Tan \delta$ .

En la figura 3.5a podemos observar que el módulo de almacenamiento presenta una sola caída a temperaturas en el intervalo de -19 a -22 °C aproximadamente. En la figura 3.5b podemos observar que las muestras curadas a 110 °C y la curada a 120 °C presentan un solo pico, asociado a su  $T_g$ , a una temperatura de -15 °C, señalando que entre ambas muestras, prácticamente no hay variación en la  $T_g$ . La única diferencia mostrada entre estas muestras fue la intensidad en el pico. Sin embargo, el material curado a 140 °C presentó dos picos relacionados uno con una transición  $\alpha$  localizada a -6 °C y la segunda a una temperatura de -18 °C, relacionado con el movimiento de cadenas laterales y entre los puntos de entrecruzamiento.

La diferencia entre la intensidad de los picos de las muestras curadas a 110 y 120 °C es debida a la diferencia en el contenido de la fase amorfa de los materiales, ya que la transición vítrea es una propiedad de la fase amorfa. Por lo tanto, la  $Tan \delta$  que es una medida de dicha transición, varía según el contenido de esta fase. De

esta manera, la altura del pico del material curado a 110 °C fue menor que la del material curado a 120 °C, ya que el primero de éstos, al encontrarse menos entrecruzado tiene mayor movilidad y, por lo tanto, mayor facilidad de formar cristales durante el enfriamiento (como se comprobó en el estudio de DSC). Debido a lo anterior, el material curado a 120 °C presentó una mayor fase amorfa que el material curado a 110 °C, por lo que la intensidad de su pico fue mayor.

La transición a la temperatura de -18 °C en el material entrecruzado a 140 °C, es atribuible a una rotación sobre su propio eje de las cadenas entre puntos de entrecruzamiento, como se encontró para una resina epóxica con diferentes grados de curado, la cual aumenta la altura de su pico secundario según se aumenta el grado de curado (Turi 1981). Por lo tanto la magnitud de este pico puede ser una medida del grado de curado que presenta el material.

La variación entre la Tg reportada por DSC y la reportada por DMA y la variación en la altura de los picos se encuentra en concordancia con lo reportado en un trabajo previo (Jaafar *et al.* 2010), lo cual se debe a la diferencia del método empleado para su obtención.

### **3.6 Análisis estructural mediante DRX**

El análisis por difracción de rayos x se llevó a cabo con el fin de conocer el ordenamiento de las cadenas, es decir, la estructura cristalina observada mediante la fusión en DSC. Los resultados se presentan en los difractogramas de la figura 3.6.

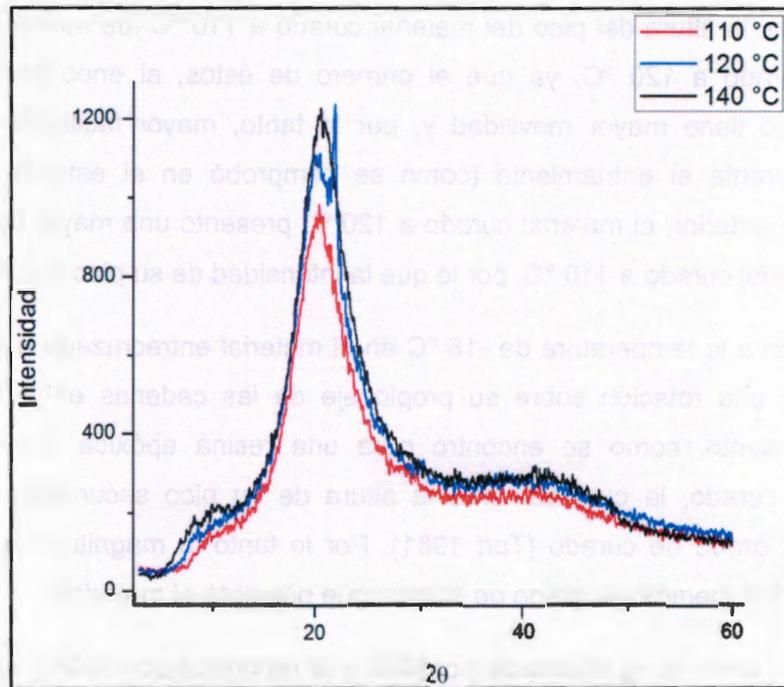


Figura 3.6 Diffractogramas de PGS entrecruzado a diferentes temperaturas.

Como se aprecia en los difractogramas obtenidos, las muestras presentan un halo amplio alrededor de los  $20.5^\circ$ , lo cual sugiere que son materiales amorfos (Chen, *et al.* 2008), aunque a diferencia de los materiales curados a 110 y 140 °C, el material curado a 120 °C presenta un pico a  $21.8^\circ$  que puede ser atribuible a cierto ordenamiento en las cadenas, el cual puede provenir de las partes no entrecruzadas del material, lo cual se encuentra en concordancia con lo observado en el trabajo realizado por Liu *et al.* en 2007, en el que se observaron picos a aproximadamente  $18$  y  $21^\circ$ , los cuales sugieren cierto orden en las cadenas del PGS.

Como se pudo observar en el DSC, el polímero curado a 120 °C presentó un pico de cristalización y uno de fusión, pero es probable que no todos los cristales, presentes después de la etapa de enfriamiento, se destruyan a la temperatura de fusión.

### 3.7 Caracterización mecánica

#### 3.7.1 Ensayos mecánicos a tensión

Las pruebas mecánicas fueron realizadas a las muestras entrecruzadas a las diferentes temperaturas, tanto en condiciones secas, como en muestras acondicionadas en agua destilada durante 24 horas a 37 °C. Esto último con el fin de detectar cómo afecta la absorción de agua a las pruebas mecánicas del material, ya que es un parámetro importante en la utilización final del PGS como biomaterial. En la tabla 3.5 se resumen las propiedades mecánicas y en la figura 3.7, se muestran las gráficas esfuerzo vs deformación representativas de estos materiales.

Tabla 3.5 Propiedades mecánicas de tensión de PGS entrecruzado a diferentes temperaturas.

Temperatura de curado (°C)	Condición analizada	Módulo de Young (MPa)	Resistencia máxima (MPa)	Deformación máxima (%)
110	Seco	0.5±0	0.4 ±0.2	74 ±5
	Húmedo	0.2 ±0	0.1 ±0	81 ±17
120	Seco	1.6±0.1	0.4±0.1	25± 2
	Húmedo	1.4 ±0.1	0.3 ±0	35 ±3
140	Seco	2.3 ±0.1	0.4 ±0	20 ±2
	Húmedo	2.5 ±0.1	0.6 ±0.1	28 ±3

N=5, ± desviación estándar.

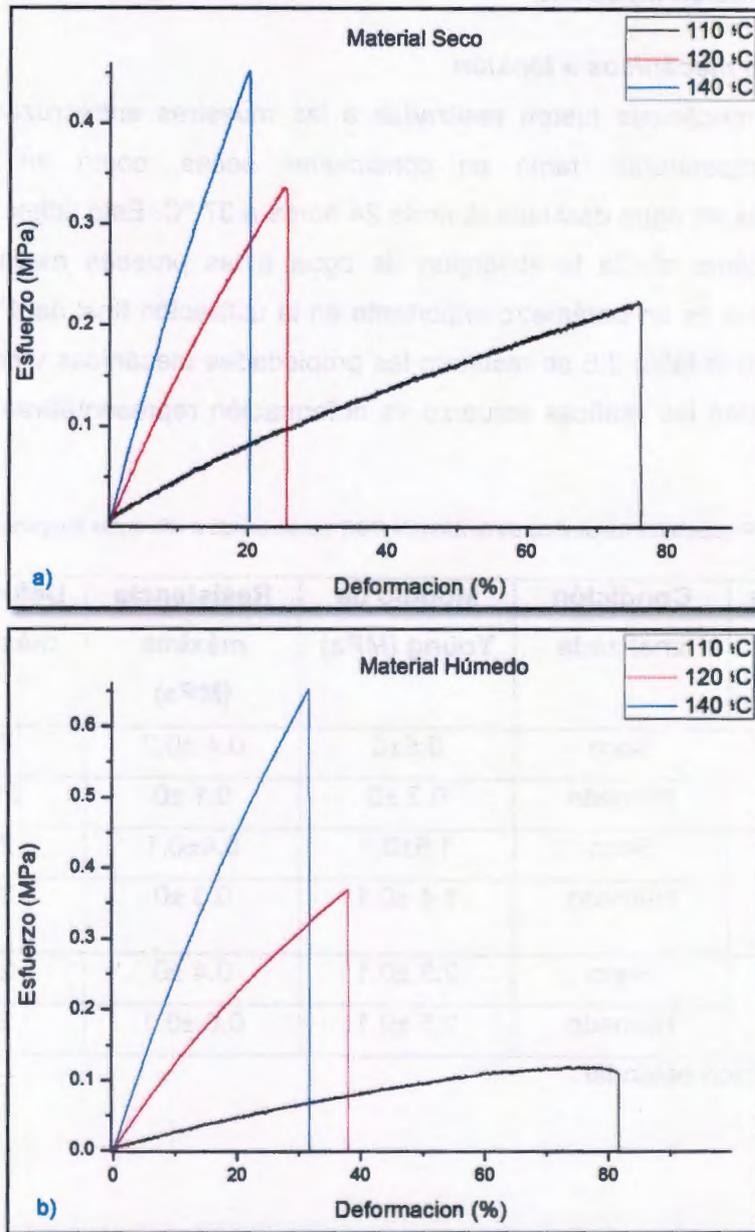


Figura 3.7 Gráficas esfuerzo-deformación de PGS entrecruzado a diferentes temperaturas para muestras secas a) y húmedas b).

Los resultados de las pruebas mecánicas indican que las propiedades mecánicas varían en gran medida según la temperatura de curado y, por tanto, con el grado

de entrecruzamiento. En las pruebas realizadas al material en seco, tal como se sintetizó, el módulo de Young aumenta con el aumento en la temperatura de curado, al igual que la resistencia máxima a la tensión. Por otro lado, la deformación máxima del material se reduce a medida que se aumenta el grado de entrecruzamiento.

Las pruebas realizadas al material en condiciones húmedas, demuestran que las propiedades del material cambian, lo cual depende de la absorción de agua que presenten. El material más afectado, por la humedad fue el entrecruzado a 110 °C ya que presentó una reducción en su módulo de 0.49 a 0.22 MPa (55%) y de 0.25 a 0.13 MPa (48%) en su resistencia máxima a la tensión, mientras que aumentó su deformación máxima de un 73 a un 81%. El material entrecruzado a 120 °C también presentó estas tendencias pero en menor medida (11.8% su módulo de Young, 23.7% su resistencia máxima y 15.2% su capacidad de deformación). Inesperadamente el material curado a 140 °C presentó un aumento en todas sus propiedades después de ser remojado 24 horas en agua.

Estas observaciones concuerdan con lo reportado por otros autores (Wang *et al.* 2002) (Yuan Li *et al.* 2012) (Chen *et al.* 2008), los cuales encontraron que el módulo de Young y la resistencia máxima a tensión aumentan, mientras que la deformación máxima disminuye según se incrementa la densidad de entrecruzamiento. Igualmente, la reducción en el módulo de Young y en la resistencia máxima a la tensión, así como el aumento en la deformación máxima cuando los materiales son sometidos a condiciones de humedad, han sido reportados en un trabajo previo (Chen *et al.* 2008). Sin embargo, se puede observar que en comparación con estas referencias, los módulos obtenidos son ligeramente mayores, esto es debido a las variaciones en la síntesis, principalmente en la presión reducida aplicada durante el entrecruzamiento, la cual fue mayor en este trabajo.

### 3.7.2 Pruebas mecánicas a compresión

Estas pruebas se realizaron únicamente en el material modificado con valproato, con el fin de conocer mejor el comportamiento del material ante esfuerzos de compresión a los cuales se podría encontrar sometido durante su posible aplicación final como biomaterial. Los resultados obtenidos se presentan en la gráfica de la figura 3.8

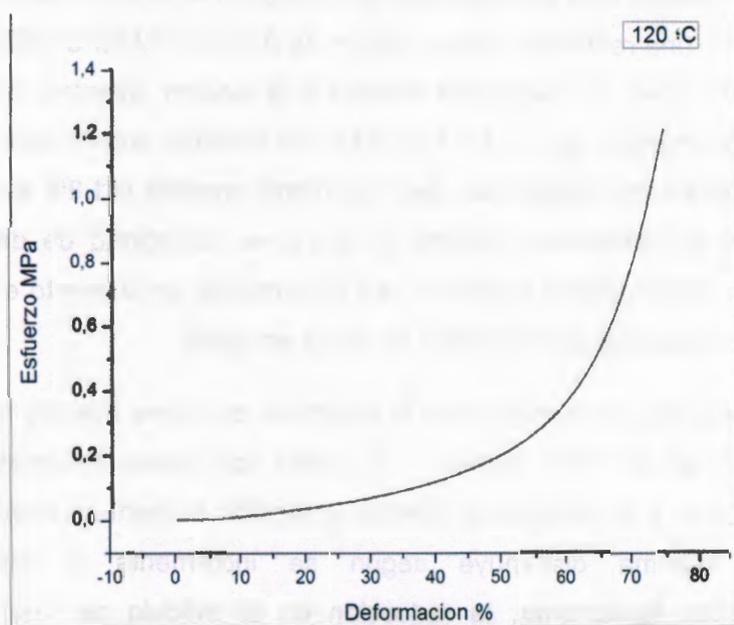


Figura 3.8 Gráfica esfuerzo- deformación de PGS curado a 120 °C.

El módulo de Young a compresión obtenido fue de  $0.15 \pm 0.01$  MPa, el esfuerzo de  $1.16 \pm 0.07$  MPa, y la deformación de  $74.49 \pm 0.16$  % hasta el momento de detener la prueba. Estos datos no concuerdan con los obtenidos mediante los ensayos a tensión, pero se sabe que los elastómeros sólidos no muestran un comportamiento lineal cuando son sometidos a tensión y a compresión. Sin embargo, éste comportamiento es similar al reportado por Pomerantzeva *et al.* en 2008, en el cual los módulos obtenidos de los ensayos a tensión son mayores que los obtenidos en los ensayos a compresión.

### 3.8 Estudios de Degradación

#### 3.8.1 Degradación acelerada

Las pruebas de degradación acelerada nos dan una idea de cómo se comportan los materiales en diferentes medios, a los cuales pueden estar expuestos en el cuerpo humano. En la tabla 3.6 se pueden observar los resultados obtenidos al someter a los materiales curados (a diferentes temperaturas) a degradación acelerada.

Tabla 3.6 Pérdida de masa de PGS entrecruzado a diferentes temperaturas sometido a degradación acelerada en distintos medios.

Temperatura de entrecruzamiento/medio	Pérdida de masa (%)			
	Agua (%)	Ácido clorhídrico (%)	Peróxido de hidrógeno (%)	Hipoclorito de sodio (%)
110 °C	22 ± 4	93.6 ± 0.9	66 ± 9	78 ± 9
120 °C	18.9 ± 0.9	83 ± 9	82 ± 4	78 ± 7
140 °C	14 ± 1	69 ± 7	71 ± 1	69 ± 6

n=3, ± desviación estándar.

Mediante la observación de estos datos, se puede concluir que el PGS se degrada en mayor medida si está menos entrecruzado y que se degrada por vía hidrolítica perdiendo hasta un 90% de masa en medios ácidos, y hasta 82% en medios oxidantes.

#### 3.8.2 Degradación/absorción de PBS

Cuando el material se expone a PBS no sólo se da la degradación, sino que existe una cinética de degradación-absorción, ya que al mismo tiempo que el material pierde enlaces éster, la red tetraédrica puede absorber el PBS. Los resultados obtenidos de la degradación en PBS concuerdan con la degradación acelerada, en la cual mientras menos entrecruzado se encuentre el material se produce mayor pérdida de masa como se puede observar en la figura 3.9. Este comportamiento se debe a que el PGS se degrada por la hidrólisis de los enlaces éster, y según se

encuentre más entrecruzado el material posee más enlaces de este tipo, como resultado se produce una degradación más lenta. Además, los materiales más entrecruzados pueden absorber menos PBS, como consecuencia menos superficie del material se encuentra en contacto con la solución, por lo que se degradan a menor velocidad que los menos entrecruzados.

El tiempo es otro factor importante en la degradación del material, ya que la pérdida de masa aumenta según se aumenta el tiempo en que el material se encuentra en contacto con el PBS, se da el mismo comportamiento en los 3 materiales, aunque para todos se da la mayor pérdida de peso durante los primeros 7 días, lo cual se encuentra en concordancia con lo reportado en un estudio previo (Chen *et al.* 2008).

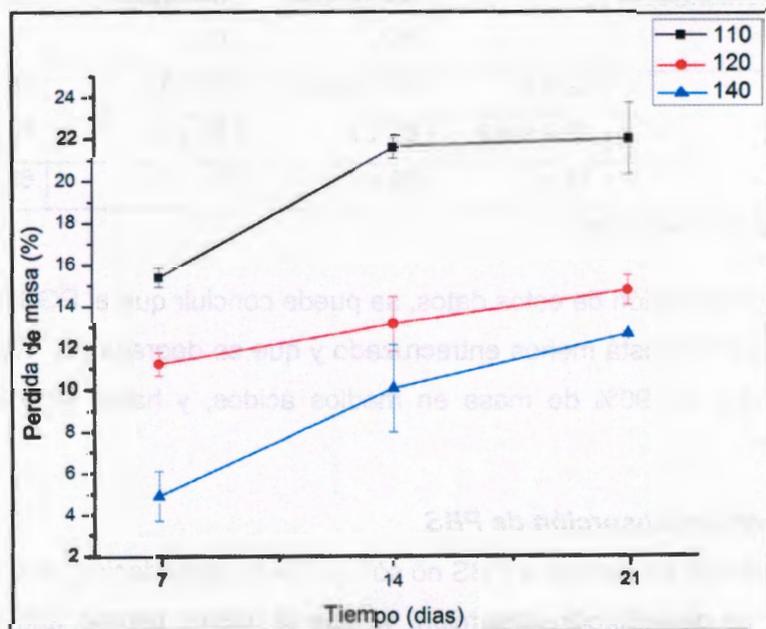


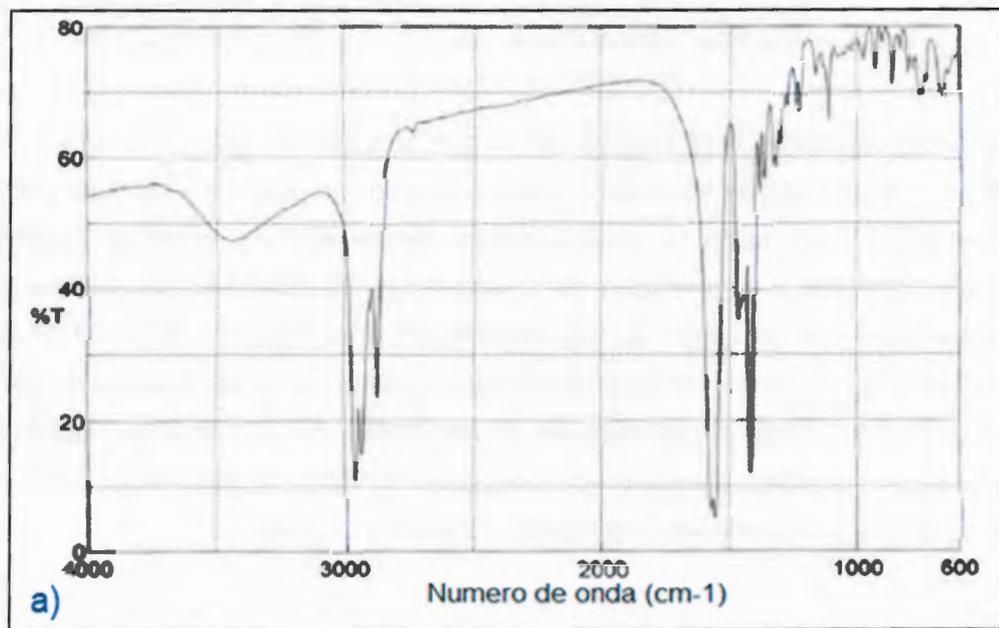
Figura 3.9 Pérdida de masa en PBS

### 3.9 Modificación con valproato de sodio

Con base en los estudios realizados a los tres diferentes materiales, se eligió el material curado a 120 °C para su modificación con valproato de sodio, pues

aunque no cuenta con un módulo de elasticidad similar al de los nervios periféricos, como el del material curado a 110 °C, presenta mejores características tanto estructurales como de degradación. Esto es, se seleccionó tratando de satisfacer los requerimientos para crear un biomaterial adecuado para la creación de un andamio para la regeneración nerviosa.

La modificación se llevó a cabo a diferentes porcentajes de valproato (5, 10 y 15 %) el cual fue mezclado con prepolímero de PGS, con la ayuda de THF como disolvente y agitación. Se lograron crear placas de elastómeros mediante la técnica de evaporación de disolvente, las cuales fueron posteriormente entrecruzadas a 120 °C durante 24 horas con una presión reducida de -20 kPa. Se obtuvieron tres diferentes elastómeros según las distintas concentraciones de valproato. En la figura 3.10 se muestran los espectros del valproato de sodio, los materiales modificados y del PGS entrecruzado a las mismas condiciones.



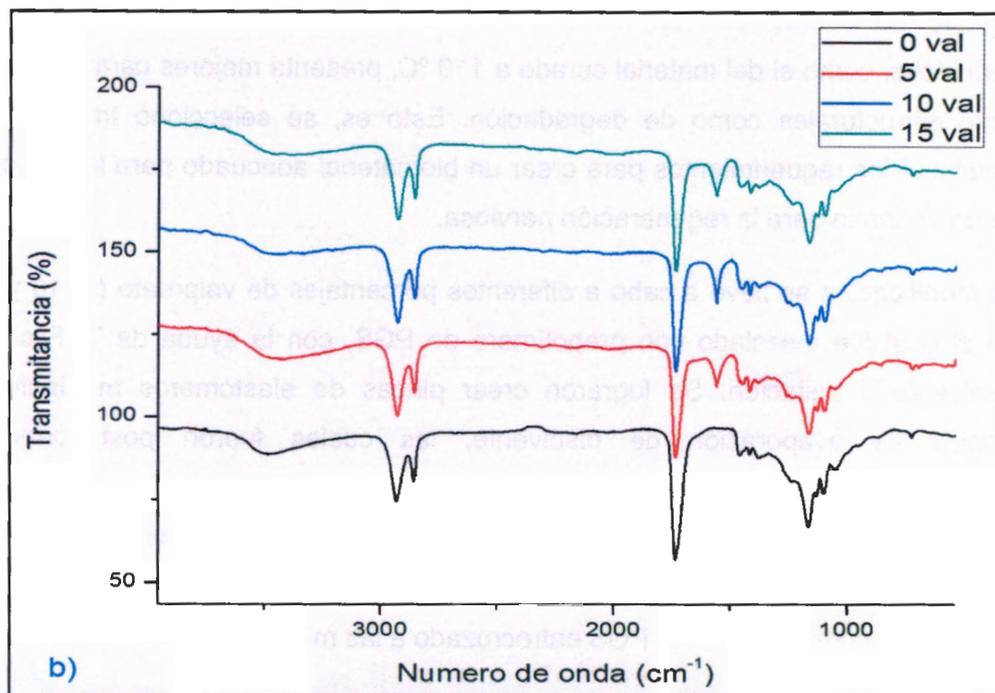


Figura 3.10 Espectros FTIR del valproato de sodio (Alsarra *et al.* 2005) a), y del PGS modificado con diferentes porcentajes de valproato b).

El espectro de IR del PGS modificado fue similar a los del PGS. Sin embargo, el cambio más importante se observó en la absorción a  $1560\text{ cm}^{-1}$ , el cual, como podemos ver en la figura 3.9 a), es un pico característico del valproato de sodio que es atribuible a la vibración de estiramiento del carbonilo del carboxilato interactuando con un catión de Na presente en la sal (Alsarra *et al.* 2005) (G. Petruševski *et al.* 2008). Por otro lado, la banda amplia a aproximadamente  $3500\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al estiramiento de los grupos OH, se traslapa según se aumenta la cantidad agregada de valproato, lo cual sugiere algún tipo de interacción química entre las cadenas de valproato y de PGS.

### 3.9.1 Caracterización térmica

Los resultados obtenidos del análisis DSC realizado a las muestras modificadas con los diferentes porcentajes de valproato variaron con respecto a los obtenidos con las muestras de PGS puro curado a las diferentes temperaturas. En la figura 3.11 se pueden observar los termogramas obtenidos tanto del PGS puro como de los materiales modificados, todos curados a 120 °C. Y en la tabla 3.7 las características de los picos obtenidos.

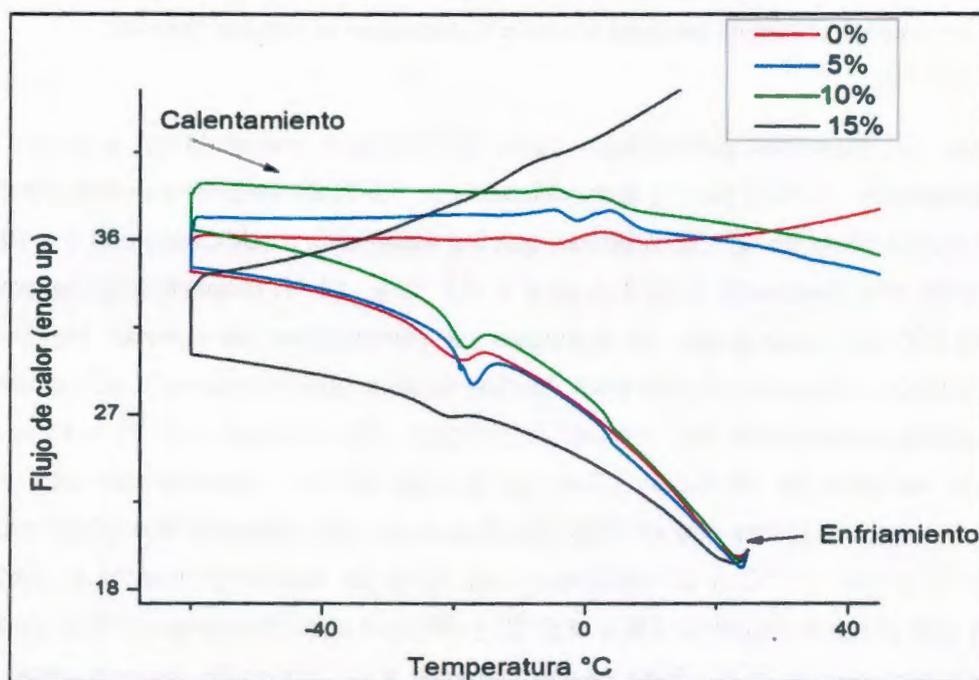


Figura 3.11 Termogramas de DSC del PGS y el PGS modificado con diferentes porcentajes de valproato

Tabla 3.7 Temperaturas y entalpias de los picos de cristalización y fusión obtenidos por DSC del PGS modificado con los diferentes porcentajes de valproato

Muestra	Temperatura de cristalización (°C)	$\Delta H_c$ (J/g)	Temperatura de fusión (°C)	$\Delta H_f$ (J/g)
0 %	-21.53	17.46	1.93	12.03
5%	-17.17	14.97	-4.65	4.32
			4.02	7.46
10%	-18.25	11.97	-4.65	2.45
			2.83	2.24
15%	-21.08	5.32	-8.48	4.8

Las  $\Delta H$  y temperaturas de los picos fueron calculados con el software Pyris de PerkinElmer.

Todas las muestras presentaron picos exotérmicos indicando un proceso de cristalización, el PGS puro y el modificado con 15 % de valproato lo presentan a una temperatura de -21 °C, mientras que los materiales modificados con 5 y 10 % de valproato presentan el mismo pico a -17 °C y -18 °C respectivamente, en la tabla 3.7, se observa que las entalpias de cristalización se reducen según se aumenta el contenido de valproato, lo cual sugiere que la presencia de valproato reduce la cristalización del material. La principal diferencia con el PGS puro se da en la temperatura de fusión ( $T_m$ ), en la cual el PGS muestra un solo pico endotérmico, mientras que el PGS modificado con 5% presenta dos picos uno a -4.6 °C y otro a 4 °C, y el modificado con 10 % de valproato muestra su primer pico que coincide con el de 5% a -4.6 °C, y otro que coincide con el de PGS puro a aproximadamente 2 °C. Esto puede deberse a la formación de dos tipos de cristales, los del PGS y los del valproato de sodio que no alcanza a reaccionar. Este fenómeno no se observó en el material modificado con 15 % de valproato, el cual solo presenta un pico endotérmico a -8 °C, posiblemente debido a que la concentración de este afecta la movilidad de las cadenas, dando como resultado cristales más pequeños.

### 3.9.2 Caracterización mecánica

Los resultados obtenidos mediante los ensayos a tensión muestran que los materiales modificados poseen un mayor módulo de Young, al igual que mayor deformación que el PGS puro obtenido a las mismas condiciones de entrecruzamiento. En la figura 3.11 podemos observar las graficas representativas de los materiales modificados.

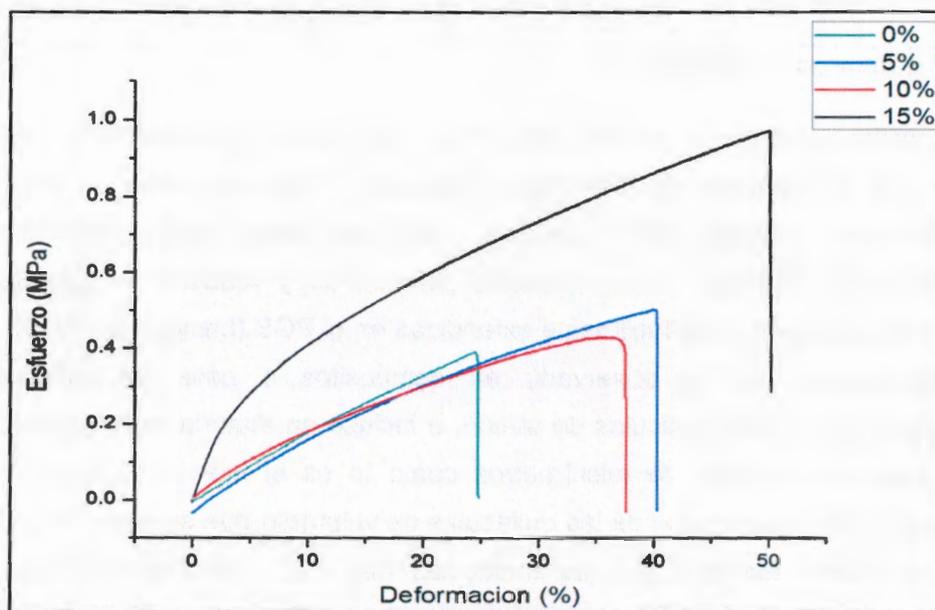


Figura 3.11 Gráficas esfuerzo-deformación de tensión del PGS modificado con valproato de sodio

Como se puede observar todos los materiales modificados presentaron curvas esfuerzo-deformación típicas de elastómeros, pues no se observa deformación plástica. Además, todos los materiales modificados presentaron mayor módulo de Young y porcentaje de deformación que el material puro como se puede observar en la tabla 3.8.

Tabla 3.8 Propiedades mecánicas de materiales modificados

Porcentaje/Propiedad	Módulo de Young (MPa)	Resistencia Máxima (MPa)	Deformación Máxima (%)
0 %	1.60 ±0.09	0.38±0.12	25.4 ± 1.8
5 %	1.75 ± 0.24	0.48 ± 0.05	41.6± 5.2
10 %	2.7 ± 0.1	0.43 ± 0.05	38.2 ± 7.7
15 %	8.5 ± 1.8	1.14 ± 0.36	48 ± 18

n= 5, ± Desviación estándar.

Una posible razón por la que los materiales modificados presentan mayor módulo de Young y capacidad de deformación, es que el valproato tiene un efecto de relleno en el material, por lo cual sus moléculas actúan como partículas que dificultan la movilidad de las cadenas poliméricas y reducen la cantidad de cadenas que pueden ser fácilmente extendidas en el PGS (Liang *et al.* 2010). Este comportamiento se ha observado en compositos a base de elastómeros reforzados con nano partículas de silicón, e incluso en materiales reforzados con partículas en el orden de micrómetros como lo es el bio-vidrio. Según estos resultados, éste es el caso de las moléculas de valproato que se encuentran en la red tetraédrica formada por las moléculas del PGS, sin presentar una alta interacción química entre ellas como se observó por FTIR.

El material modificado con 10 % de valproato es el material modificado con menor capacidad de deformación (sin llegar a ser significativo  $p>0.05$ ), posiblemente debido a que las moléculas del valproato reaccionan con el glicerol en una proporción que favorece el aumento en la rigidez de las cadenas que el efecto de relleno.

### 3.9.3 Viabilidad celular evaluada por MTT.

Esta prueba se realizó con el fin de conocer la viabilidad de linfocitos cuando son expuestos al material obtenido de la modificación del PGS con el valproato. Los resultados obtenidos en este análisis se pueden ver en la gráfica de la figura 3.12.

Los linfocitos, son células linfáticas, un tipo de leucocitos mayormente conocidos como glóbulos blancos, miden aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  y representan un 30% de la sangre periférica. Son los encargados de la producción de anticuerpos y de la eliminación de células defectuosas, reaccionan ante cuerpos extraños; y crecen en suspensión en un medio de cultivo.

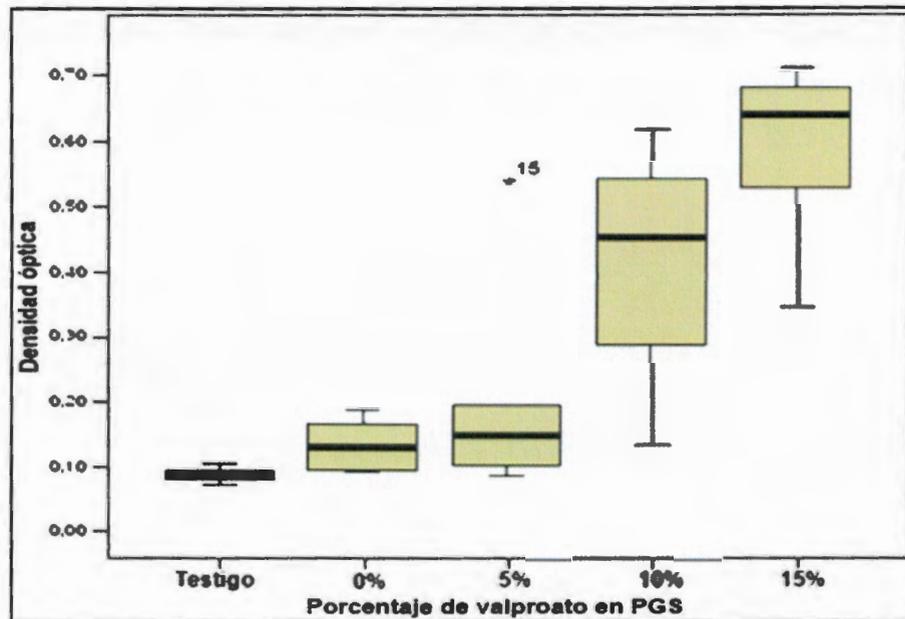


Figura 3.92 Resultados de los análisis MTT. Densidad óptica vs material probado.

De la gráfica podemos observar que tanto el PGS como el PGS modificado con 5% de valproato presentan resultados muy similares a los del lote testigo, sin presentar cambios significativos entre ellos ( $p > 0.05$ ), como se corroboró mediante el análisis estadístico Tukey realizado a los datos, lo cual indica que éstos materiales no afectan la viabilidad de los linfocitos, y por el contrario se nota un ligero aumento en la densidad óptica, que sugiere un mayor número de células activas. Este mismo análisis muestra que no se dieron cambios significativos entre los materiales modificados con 5 y 10 % ( $p > 0.05$ ), ni entre los materiales con 10 y 15 % ( $p > 0.05$ ) de valproato, aunque se puede observar que el error en estos últimos es muy grande, esto se debe a que cada individuo tiene una respuesta

particular, pero en ninguno de los casos se registró una disminución significativa de la actividad mitocondrial. El análisis estadístico, confirma la interpretación de que no hay toxicidad del valproato en ninguno de los materiales.

Aunque, en esta prueba no se detectó toxicidad, es conveniente llevar a cabo más pruebas para corroborar la ausencia de citotoxicidad y de genotoxicidad (daño al material genético) tanto del PGS como de los materiales modificados para su uso como guía nerviosa.

## CONCLUSIONES.

Mediante los resultados obtenidos en el desarrollo de este trabajo, y a través del análisis de los mismos, se puede llegar a las siguientes conclusiones:

- Se obtuvo poli(glicerol sebacato), por medio de una polimerización en masa, para la cual se necesita un tiempo considerable desde la etapa de prepolimerización, hasta la obtención del polímero entrecruzado.
- Las características del polímero final son ajustables, variando la temperatura de curado. A bajas temperaturas se obtiene un polímero poco entrecruzado mientras que al aumentar la temperatura se aumenta también la densidad de entrecruzamientos en el material.
- El grado de entrecruzamiento varía las propiedades del material final, modificando propiedades como temperaturas de cristalización y fusión, módulo de Young, temperatura de transición vítrea, porcentajes de absorción de disolvente y contenido de fracción soluble, así como su comportamiento ante diferentes medios de degradación.
- Al modificar el PGS con el valproato de sodio cambiaron sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas, como se comprobó por los análisis realizados al nuevo material. El valproato aumentó el módulo de Young de los materiales sin sacrificar la cantidad de deformación que puede sufrir, de la misma manera que no presentó toxicidad para linfocitos.

## **TRABAJO FUTURO.**

Una vez finalizada la caracterización del PGS y habiendo modificado éste con valproato de sodio, conviene completar la caracterización del material modificado, para lo cual se sugieren los siguientes análisis:

- Estudios de densidad, hinchamiento, contenido de fracción soluble y densidad de entrecruzamiento.
- Difracción de rayos-X.
- Microscopía electrónica de barrido (SEM-EDX), con lo que se busca conocer la dispersión del valproato en la matriz del PGS y la presencia de sodio aportado por el valproato.
- Degradación en solución amortiguadora de fosfatos.
- Pruebas de citotoxicidad para células de Schwann.
- Pruebas de cinética de liberación del valproato.
- Creación de una guía para regeneración nerviosa a base de Poli(glicerol sebacato) modificado con valproato de sodio.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. Snell, *Neuroanatomia Clinica*. Editorial Medica Panamericana S.A., Montevideo: (2001) (págs. 2-3, 35-35, 115-118)
- [2] C.A. Sundback; J.Y Shyu; Y. Wang; W. Faquin; R.S. Langer; J. Vacanti.; T.S Hadlock. Biocompatibility analysis of poly(glycerol sebacate) as a nerve guide material. *Biomaterials* 26, 5454-5464, (2005).
- [3] M.R. Raffae. Principles of peripheral nerve repair. *Textbook of Small Animal Orthopaedics*. Saunders, New York, (1985), (capitulo 65).
- [4] M. Jean; L.E. Beau. Ultrastructural and morphometric analysis of long-term peripheral nerve regeneration through silicone tubes. *Journal of Neurocytology* , 161-172. (1988).
- [5] P. Aebischer; V. Gubnard; S. Brace. Peripheral Nerve Regeneration Through Blind-Ended Semipermeable Guidance Channels: Effect of the Molecular Weight Cutoff. *The Journal of Neuroscience* 9, 3590-3595, (1989).
- [6] W. F. A. Den Dunnen; J. M. Schakenraad; G. J. Zondervan; A. J. Pennings; B. P. H. Robinson. A new PLLA/PCL copolymer for nerve regeneration. *Journals of Materials Science* , 521-525, (1993)
- [7] T. Hadlock; J. Elisseeff; R. Langer; J. Vacanti; M. E. Cheney M. E. J. A tissue-engineered conduit for peripheral nerve repair. *Arch otolaryngol head neck surg* , 124: 1081-1086, (1998)
- [8] P. H. Robinson; B. Van der Lei; H. J. Hoppen; J.W. Leenslag; A. J. Pennings.. nerve regeneration through a two-ply biodegradable nerve guide in the rat and the influence of acth4-9 nerve growth factor. *Microsurgery* 12, 412-419, (1991).
- [9] G. Lundborg. Reorganization and orientation of regenerating nerve fibers, perineurium and epineurium performed mesothelial tubes: and experimental study on the sciatic nerve of rats. *Journals of Neuroscience research* 6, 265-281, (1981).
- [9] N. Suematsu; Y. Atsuta; T. A. Hirayama. Vein graft for repair peripeal nerve gap. *Journals of reconstruction microsurgery* 4, 313-318, (1988).
- [10] B.S. Kim; J. J. Yoo; A. Y. Atala. Peripheral nerve regeneration using acellular nerve grafts. *Journals of biomedical materials research* 68A, 201-209, (2004).

- [11] A. Subramanian; U. M. Krishnan; S. Sethraman. Review: Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: biomaterial mediated neural regeneration. *Journal of biomedical science* 16,108, (2009).
- [12] F. Uwe; H. Andreas; S. Katja; C.S. Sigrid; G. Milauscha; Z. Andrea; P. Woranan; Z. Stefan. A starPEG-heparin hydrogel platform to aid cell replacement therapy for neurodegenerative diseases. *biomaterials* 30, 5049-5060, (2009).
- [13] S. Amado; M. J. Simoes; Armada da Silva; A. L. Luis; Y. Shirotsaki; S. Lopes. Use of hybrid chitosan membranes and NIE-115 cells for promoting nerve regeneration in axotomy rat model. *biomaterials* 29, 4409-4419, (2008).
- [14] K. E. Crompton; J. D. Goud; R.V. Bellamkonda; T.R. Gengenbach; G. Finkelstein. Polylysine-functionalised thermoresponsive chitosan hydrogel for neural tissue engineering. *Biomaterials* 28, 441-449, (2007).
- [15] Y. Haile; S. Berski; G. Drager; A. Nobre; K. Stummeyer; B. Gerardy-Schahn. The effect of modified polysialic acid based hydrogels on the adhesion and viability of primary neurons and glial cells. *Biomaterials* 29, 1880-1891, (2008)
- [16] *Sistema nervioso central y periférico. Neuroanatomía.* (2012 de Julio de 18). Recuperado el 18 de Septiembre de 2012, de Sistema nervioso central y periférico. Neuroanatomía: <http://neuroanatomia.info/sistemas-nerviosos-central-y-periferico.html>
- [17] L.N. Novikova; J. Pettersson; M. Brohlin; M. Wiberg; L.N. Novikov. Biodegradable poly-D-hydroxybutyrate scaffold seeded with Schwann cells to promote spinal cord repair. *biomaterials* 29, 1198-1206, (2008).
- [18] J. Lee; M.J. Cuddihy; N.A. Kotov. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Engineering Part B*, 14:61-86, (2008).
- [19] S.Y. Chew; R. Mi; A. Hoke; K.W. Leong. The effect of the alignment of electrospun fibrous scaffolds on Schwann cells maturation. *biomaterials* 29, 653-661, (2008).
- [20] E. Schnell. Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly-ε-caprolactone and a collagen/poly-ε-caprolactone blend. *Biomaterials* 28, 3012-3025, (2007).
- [21] S.H. Oh; J.H. Kim; K.S. Song; B.H. Jeon. Peripheral nerve regeneration within an asymmetrically porous PLGA/pluronic F127 nerve guide conduit. *biomaterials* 29, 1601-1609, (2008).

- [22] Z. Zhang; M. Rouabhia M; Z. Wang; C. Roberge; G. Shi. Electrically conductive biodegradable polymer composite for nerve regeneration: electricity stimulated neurite outgrowth and axon regeneration. *Artificial Organs* 31, 13-22, (2007).
- [23] X. Duan; C. McLaughlin; M. Griffith; H. Sheardown. Biofunctionalization of collagen for improved biological response: scaffolds for corneal tissue engineering. *Biomaterials* 28,78-88, (2007).
- [24] C.J.Bettinger. Microfabrication of poly(glycerol sebacate) for contact guidance applications. *Biomaterials* 27,2558-2565, (2006).
- [25] T.B. Bini; S. Gao; X. Xu; S. Wang. Peripheral nerve regeneration by microbraided poly(L-lactide-co-glycolide) biodegradable polymer fibers. *Journals of Biomedical Materials Research* 68A,286-295, (2004).
- [26] C. Sundback. Manufacture of porous polymer nerve conduits by a novel low-pressure injection molding process. *Biomaterials* 24, 819-830, (2003).
- [27] L. Flynn; P.D Dalton; M.S. Shoichet. Fiber templating of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) for neural tissue engineering. *Biomaterials* 24,4265-4272, (2003).
- [28] P.D. Dalton; L. Flynn; M.S. Shoichet. Manufacture of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate). *Biomaterials* 23,3843-3851, (2002).
- [29] Y. Haile; K. Haasterd; K. Cesnulevicius; K. Stummeyer. Culturing of glial and neuronal cells on polysialic acid. *Biomaterials* 28,1163-1173, (2007).
- [30] F. Loaysa. Anatomia del nervio facial. *Revista Peruana de Oftalmologia*38-43, (1995).
- [31] J.L. Durury; D.J. Mooney. Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 24, 4337-4331, (2003).
- [32] H. Cao; T. Liu; S.Y. Chew. The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering. *Advanced drugs delivery reviews* 61(12),:1055-64, (2009).
- [33] Woerly S. Heterogeneous PHPMA hydrogels for tissue repair and axonal regeneration in the injured spinal cord. *Journals of Biomaterials Science* 9, 681-711, (1998).
- [34] P.M.Crapo, Y. Wang. Physiologic Compliance in Engineered Small-diameter Arterial. *Biomaterials* , 1-13, (2010).

- [35] Q.Z. Chen; A. Bismarck; U. Hansend, S. Junaidd. Characterisation of a soft elastomer poly(glycerol sebacate) designed to. *Biomaterials* 29, 47-57, (2008).
- [36] W. L. Neeley; S. Redenti; H. Klassen; S. Tao. A microfabricated scaffold for retinal progenitor cell grafting. *Biomaterials*, 418-426, (2008).
- [37] Y. Wang; G.A. Ameer; B.J. Sheppard; R. Langer. A tough biodegradable elastomer. *Nature Biotechnology* 20, 602-606, (2002).
- [38] A. Patel, A. K. Gaharwar, G. Iviglia, H. Zhang, S. Mukundan, S. M. Mihaila, D. Demarchi, A. Khademhosseini. Highly elastomeric poly(glycerol sebacate)-co-poly(ethylene glycol) amphiphilic block copolymers. *Biomaterials* 43, 39-52, 2011
- [39] I.H. Jaafar; M.M. Ammar; S. Jedlicka; R.A. Pearson; J.P. Coulter. Spectroscopic evaluation, thermal, and thermomechanical characterization of poly(glycerol-sebacate) with variations in curing temperatures and durations. *Materials Science* 45, 2525–2529, (2010).
- [40] Q. Liu; M. Tian; T. Ding; R. Shi; Y. Feng. Method, Preparation and Characterization of a Thermoplastic Poly(glycerol sebacate) Elastomer by Two-Step. *Journals of applied polymer science* 103, 1412–1419, (2007).
- [41] R. Rai. Synthesis, properties and biomedical applications of poly(glycerol sebacate) (PGS): a review. *Progress in polymer science* 37, 1051-1078, (2012).
- [42] A.G. Mitsaka; A.M. Dunna; S.J. Hollister. Mechanical characterization and non-linear elastic modeling of poly(glycerol sebacate) for soft tissue engineering. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* , 3-15, (2011).
- [43] S.L. Liang; W.D. Cook; G.A. Thouas; Q.Z. Chen. The mechanical characteristics and in vitro biocompatibility of poly(glycerol sebacate)-Bioglass elastomeric composites. *Biomaterials* , 8516-8529, (2010).
- [44] C. A. Sundback. Behavior of poly(glycerol sebacate) plugs in chronic tympanic membrane perforations. *J Biomed Mater Res* 100B, 1943–1954, (2012).
- [45] Y. Wang; K.M. Kim; R. Langer. In vivo degradation characteristics of poly (glycerol sebacate). *Journals of biomedical materials research* 66A, 192-7, (2003).
- [46] S.S. Cui; C.P. Yang; R.S. Bowen. valproic acid enhances axonal regeneration and recovery of motor function after sciatic nerve axotomy in adult rats. *Brain research* , 229-236, (2003).

- [47] W. Fei. The mood stabilizer valproic acid induces proliferation and myelination of rat Schwann cells. *Neuroscience Research* , 383-390, (2011).
- [48] Y. In-Tag. Valproic acid promotes neuronal differentiation by induction of proneural factors in association with H4 acetylation. *Neuropharmacology* , 473-480,(2009).
- [49] M.E. Chavez Delgado; S. Castro Castañeda; J. Jimenez Rodriguez; J Restelli Villasante; R. Garzon Zamora; E. Real Marquez. Secciones Traumaticas de Nervios Perifericos en Mano. *Revista Medica IMSS* 39(4), 295-302,(2001).
- [50] L. Sperling. *Introduction To Physycal Polymer Science Fourth Edition*. New Jersey: Wiley Interscience, (2006).
- [51] S. Kalyan. *High-resolution Calorimetry on Thermal Behavior of Glycerol*, Phd tesis, Chiba University, Chiba, Japan, (2009).
- [52] E. Turi. *Thermal Characterization of Polymeric Materials*. Orlando, Florida: Academic Press, INC, (1981).
- [53] Y. Li; W.D. Cook; C. Moorhoff; W. Huang; Q. Chen. Synthesis, characterization and properties of biocompatible poly(glycerol sebacate) pre polymer and gel. *society of chemicl industry*, (2012) .
- [54] I. Pomerantzeva; N. Krebs; A. Harts; C.M. Neville; A.Y. Huang; C.A. Sundback. Degradation behavior of poly(glycerol sebacate). *Journals of biomedical materials research part A*, 1038-1047, (2008).
- [55] I.A. Alsarra; M. Al-Omar; F. Belal. Valproic Acid and Sodium Valproate: Comprehensive Profile. *Profiles of drug substances, excipients, and related methodology* vol 32, 209-240, (2005).
- [56] G. Petruševski. *Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of the Solvates and Polymorphs of Sodium Valproate, Active Component of the Anticonvulsant Drug Epilim®*. EUCMOS, (2008).
- [57] C.J., B.. Biodegradable elastomers for tissue engeengering and cell biomaterials interactions. *Macromolecular Journals* , 11: 467-482, (2011).
- [58] J. Dey. Development of biodegradable crosslinked urethane-doped polyester elastomers. *Biomaterials* , 29: 4637-4649, (2008).

- [59] J. Doshi. electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics* , 151-160, (1995).
- [60] F. Langone; S. Lora; F.M. Veronese; P. Caliceti. Peripheral nerve repair using a poly(organo)phosphazene tubular prosthesis. *Biomaterials* , 347-353, (1995).
- [61] G., L. *Nerve injury repair*. New York: Longman Group UK, (1988).
- [62] W. Gamboa. Producción de micro y nano fibras a partir de la tecnica "electrospinning" para aplicaciones farmacológicas. *VII Congreso de la sociedad cubana de bioingeniería* (pág. artículo T053). Habana: Sociedad cubana de bioingeniería, (2007).
- [63] B.G. Gold; K. Katoh; T. Storm-Dickerson. The immunosuppressant FK506 increases the rate of axonal regeneration in rat sciatic nerve. *The Journal of Neuroscience* 15(11), 7509-7516, (1995).
- [64] T. Hadlock. A polymer foam conduit seeded with Schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration. *Tissue engineering* , 6(2): 120-127, (2000).
- [65] M. Hohman. Electrospinning and electrically forced jets stability theory. *Physics of fluids* , 2201-2220, (2001).
- [66] J.S. Kwon; G.H. Kim; D.Y. Kim; S.M. Yoon. Chitosan-based hydrogels to induce neuronal differentiation of rat muscle-derived stem cells. *International Journal of Biological Macromolecules* , 974-979, (2012).
- [67] A. Kotwal; C.E. Schmidt. Electrical stimulations alters protein adsorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials. *Biomaterials* 22, 1055-1064, (2001).
- [68] F. Langone. Peripheral nerve repair using a poly (organo) phosphazene tubular prosthesis. *Biomaterials* , 16: 347-353, (1995).
- [69] P. Mussoke-Zawedde; S.M. Shoichet. Anisotropic three-dimensional peptide channels guide neurite outgrowth within a biodegradable hydrogel matrix . *Biomedical Materials* 1, 162-169, (2006).
- [70] Q. Liu; M. Tiang; R. Shi; L. Zhang; D. Chen; W. Tian. Structure and Properties of Thermoplastic Poly(glycerol sebacate) Elastomers Originating from Prepolymers with Different Molecular Weights. *Journal of applied polymer science* , 1131-1137, (2006).

[71] M. Widmer; G. Evans; P. Gupta; L. Lu. Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration. *Biomaterials* 19, 1945-1955, (1998).

[72] F. Yi. Poly(glycerol sebacate) nanofiber scaffolds by core/shell electrospinning. *Macromolecular Journals* 8, : 803-806, (2008).

[73] Q. Zhang; Y. Zhao; S. Yan; Y. Yang; H. Zhao; M. Li. preparation of uniaxial multichannel silk fibroin scaffolds for guiding primary neurons. *Acta Biomaterialia* 8, 2628-2638, (2012).

