



Universidad de
La Sabana

**POLIURETANOS SINTETIZADOS A PARTIR DE ACEITE DE HIGUERILLA Y
DIISOCIANATOS CANDIDATOS EN APLICACIONES BIOMÉDICAS COMO
MATERIALES PARA SUTURAS NO ABSORBIBLES**

YOMAIRA LISNEDY USCÁTEGUI MALDONADO, M.Sc.

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA
DOCTORADO EN BIOCENCIAS
CHÍA, COLOMBIA
2019**

**POLIURETANOS SINTETIZADOS A PARTIR DE ACEITE DE HIGUERILLA Y
DIISOCIANATOS CANDIDATOS EN APLICACIONES BIOMÉDICAS COMO
MATERIALES PARA SUTURAS NO ABSORBIBLES**

**Proyecto de tesis para optar por el título de:
Doctor en Biociencias**

**Presentado por
YOMAIRA LISNEDY USCÁTEGUI MALDONADO**

**Directores
MANUEL FERNANDO VALERO VALDIVIESO
Doctor en Ingeniería Química**

**LUIS EDUARDO DÍAZ BARRERA
Doctor en Ciencias - Química**

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA
DOCTORADO EN BIOCENCIAS
CHÍA, COLOMBIA
2019**

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen de Manare por sus infinitas bendiciones durante mi vida.

A mis padres, por sus enseñanzas, por su apoyo incondicional, por su comprensión y por su paciencia.

A mis tías Paulina, Angelina y Leonor quienes me animan en todo lo que hago, me apoyan y siempre están ahí cuando las necesito.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser mi guía en todos los momentos y no dejarme desfallecer en tiempos difíciles.

Al Dr. Manuel Fernando Valero Valdivieso por la confianza depositada en mí, por la oportunidad que me brindó, por sus enseñanzas y orientaciones durante toda esta etapa y por ser un ejemplo a seguir.

Al Dr. Luis Eduardo Díaz Barrera por su colaboración, sus conocimientos y apoyo durante este proceso doctoral.

Al Dr. José Antonio Gómez Tejedor y la Dra. Ana Vallés Lluch, investigadores del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la Universidad Politécnica de Valencia (España), por ser mis tutores durante la estancia doctoral, por sus aportes de enriquecimiento académico, por la valiosa colaboración y apoyo durante este proceso.

A Guillermo Vilariño, Rubén Martín, María Herrero, Amparo Baiget, Carmen Antolinos, Alfredo Salgado, entre otros investigadores del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la Universidad Politécnica de Valencia (España), por la colaboración, enseñanza y buena acogida durante la estancia doctoral.

A mis compañeros y amigos del postgrado, Natalia Conde, Carolina Arango, Liliana Santacruz, Adriana Castro, Sandra Portillo, Ingrid Pulido, Néstor Sánchez, Jeysson Sánchez y todos los que de una u otra forma estuvieron presentes con su ejemplo, experiencias, apoyo y amistad.

Al grupo de trabajo de polímeros e investigadores del grupo de investigación del laboratorio GEMA, Fabián Arévalo, Santiago Villegas, Carolina Ibarra, Said Arévalo, María Paula Morales y Bernay Cifuentes por el apoyo y colaboración durante este período.

A los auxiliares de los laboratorios de la facultad de Ingeniería, Martha Guerrero, María Sanabria, Pilar Gómez y Jorge Rodríguez por su apoyo y colaboración durante las largas jornadas de investigación.

A Camilo Estacio por la colaboración y apoyo durante todo este proceso.

A mis hermanos y demás familiares por todo el apoyo y comprensión durante todo el tiempo de este proceso doctoral.

A todas y cada una de las personas que durante esta etapa estuvieron presentes en el ámbito personal y académico con su apoyo y colaboración.

A la Dirección General de Investigación de la Universidad de La Sabana por la financiación de proyectos de convocatoria interna, y al Grupo de Energía, Materiales y Ambiente de la Universidad de La Sabana por permitir el desarrollo de esta tesis doctoral en su laboratorio.

A la Beca-Préstamo de Colciencias convocatoria 6172-2014 por medio de la Gestión de Becas Externas (GBE), por permitirme la realización de este doctorado.

A la Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado (AUIP) por la beca de movilidad internacional la cual consistió en los pasajes ida y regreso para la realización de la estancia doctoral.

Al Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la Universidad Politécnica de Valencia (España) por permitir el desarrollo de la experimentación durante la estancia doctoral.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Ch - Quitosano (de *Chitosan*)

DMEM – Medio de cultivo celular (de *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMTA - Análisis térmico dinamo-mecánico (de *Dynamic Mechanical Thermal Analysis*)

DSC - Calorimetría Diferencial de Barrido (de *Differential Scanning Calorimetry*)

DTG - Primera derivada del termograma TGA

E` - Módulo de almacenamiento o Módulo elástico

E. coli - *Escherichia coli* (ATCC® 2469)

FESEM - Microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (de *Field-Emission Scanning Electron Microscope*)

FTIR - Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (de *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*)

HDFa - Fibroblasto dérmico primario de humano HDFa (ATCC® PCS-201-012™)

HDI - Diisocianato de hexametileno (de *Hexamethylene Diisocyanate*)

HMDI - 4,4'-metilenbis(isocianato de ciclohexilo) (de *Hydrogenated MDI: 4,4'-Methylenebis(cyclohexyl isocyanate)*)

IFN- γ – Interferón gamma

IPDI - Diisocianato de isoforona (de *Isophorone Diisocyanate*)

L-929 - Fibroblastos de tejido conectivo subcutáneo de ratón L-929 (ATCC® CCL-1)

LPS – Lipopolisacárido

MRC-5 - Fibroblastos humanos de pulmón MRC-5 (ATCC® CCL-171™)

MTT - Bromuro de metiltiazolildifenil-tetrazolio (de *Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*), Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio

NCO - Grupo funcional de isocianatos (-N=C=O)

NIH/3T3 - Fibroblasto embrionario de ratón NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™)

P.1 - Polioliol derivado del aceite de higuera sin modificación

P.2 - Polioliol modificado con 1,32% de mol de pentaeritritol/mol de aceite de higuera

P.3 - Polioliol modificado con 2,64% de mol de pentaeritritol/mol de aceite de higuera

P. aeruginosa - *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853)

PBS - Buffer fosfato salino (de *Phosphate Buffered Saline*)

PCL - Policaprolactona diol (de *Polycaprolactone diol*)
PMA - Forbol-12-Miristato-13-Acetato (de *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*)
PP - Polipropileno
PUs – Poliuretanos
RPMI – Medio de cultivo celular (de *Roswell Park Memorial Institute*)
S. aureus - *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)
SD – Desviación estándar (de *Standard Deviation*)
Tan δ - Factor de pérdidas o Tangente del desfase
TNF- α – Factor de necrosis tumoral α (de *Tumor Necrosis Factor α*)
 T_g - Temperatura de transición vítrea (de *Glass Transition Temperature*)
TGA - Análisis termogravimétrico (de *Thermogravimetric Analysis*)
THP-1 - Línea celular monocitaria humana THP-1

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	viii
TABLA DE CONTENIDO.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	xvi
RESUMEN.....	1
1. CAPÍTULO 1. MARCO REFERENCIAL.....	3
1.1 POLÍMEROS COMO BIOMATERIALES.....	3
1.2 PUs EN EL CAMPO BIOMÉDICO.....	3
1.3 QUÍMICA DE LOS POLIURETANOS.....	5
1.4 MONÓMEROS.....	6
1.4.1 Diisocianatos.....	6
1.4.2 Polioles.....	9
1.4.3 Aditivos.....	11
1.5 SUTURAS BIOMÉDICAS.....	12
1.6 CONCLUSIONES.....	14
1.7 REFERENCIAS.....	15
2. CAPÍTULO 2. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS, MECÁNICAS Y MORFOLÓGICAS DE LOS MATERIALES PARA SUTURAS EN FUNCIÓN DE LA ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS MONÓMEROS EMPLEADOS.....	22
2.1 RESUMEN.....	22
2.2 INTRODUCCIÓN.....	23
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
2.3.1 Reactivos.....	25
2.3.2 Obtención de polioles.....	25
2.3.3 Síntesis de poliuretanos.....	25
2.3.4 Ensayos mecánicos.....	26
2.3.5 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).....	26
2.3.6 Análisis térmico.....	27
2.3.7 Carácter hidrofílico.....	27
2.3.8 Determinación de densidad.....	28
2.3.9 Análisis térmico dinamo-mecánico (DMTA).....	28
2.3.10 Microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM).....	28
2.3.11 Análisis estadístico.....	28
2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
2.4.1 Propiedades mecánicas de PUs.....	29
2.4.2 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).....	36
2.4.3 Análisis térmico.....	37
2.4.4 Carácter hidrofílico.....	40
2.4.5 Determinación de densidad.....	44

2.4.6	Análisis térmico dinamo-mecánico (DMTA).....	45
2.4.7	Microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM)	47
2.5	CONCLUSIONES	47
2.6	BIBLIOGRAFÍA	48
3.	CAPÍTULO 3. BIODEGRADABILIDAD Y BIOCOMPATIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LOS MATERIALES PARA SUTURAS EN FUNCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LOS SEGMENTOS Y LA DENSIDAD DE ENTRECruzAMIENTO DE LOS POLIURETANOS	56
3.1	RESUMEN	56
3.2	INTRODUCCIÓN	57
3.3	MATERIALES Y MÉTODOS	59
3.3.1	Reactivos	59
3.3.2	Material biológico	59
3.3.3	Ensayos de biodegradabilidad <i>in vitro</i>	59
3.3.4	Ensayo <i>in vitro</i> de viabilidad celular por el método MTT	60
3.3.5	Citotoxicidad de los subproductos de la degradación	61
3.3.6	Técnicas inmunocitoquímicas	61
3.3.7	Ensayo <i>in vitro</i> de actividad antibacteriana.....	62
3.3.8	Análisis estadístico	63
3.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
3.4.1	Ensayos de biodegradabilidad <i>in vitro</i>	63
3.4.2	Ensayo <i>in vitro</i> de viabilidad celular por el método MTT	66
3.4.3	Citotoxicidad de los subproductos de la degradación	69
3.4.4	Técnicas inmunocitoquímicas	70
3.4.5	Ensayo <i>in vitro</i> de actividad antibacteriana.....	73
3.5	CONCLUSIONES	75
3.6	BIBLIOGRAFÍA	76
4.	EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL POSIBLE EFECTO INFLAMATORIO DE MATERIALES BASADOS EN POLIURETANOS PARA SUTURAS NO ABSORBIBLES.....	81
4.1	RESUMEN	81
4.2	INTRODUCCIÓN	81
4.3	MATERIALES Y MÉTODOS	83
4.3.1	Reactivos y línea celular.....	83
4.3.2	Diferenciación a macrófagos y estimulación de inflamación.....	83
4.3.3	Evaluación de procesos inflamatorios	83
4.3.4	Inmunoensayo.....	84
4.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	84
4.5	CONCLUSIONES	90
4.6	BIBLIOGRAFÍA	91
5.	CAPÍTULO 5. EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i> DE LOS MATERIALES CANDIDATOS PARA EL DISEÑO DE SUTURAS BIOMÉDICAS	93
5.1	RESUMEN	93
5.2	INTRODUCCIÓN	93
5.3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	94

5.3.1	Animales.....	94
5.3.2	Ensayos <i>in vivo</i> de poliuretanos.....	94
5.3.3	Análisis histopatológico	95
5.3.4	Análisis estadístico	96
5.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	96
5.5	CONCLUSIONES	101
5.6	BIBLIOGRAFÍA	101
6.	CONCLUSIONES.....	103
7.	PERSPECTIVAS	106
	ANEXOS.....	107
	ANEXO 1. POLIURETANOS SINTETIZADOS.....	107
	ANEXO 2. PROPIEDADES MECÁNICAS DE LOS PUs.....	112
	ANEXO 3. ESPECTRO FTIR DE LOS PUs.....	118
	ANEXO 4. TEMPERATURA DE TRANSICIÓN VÍTREA DE PUs SINTETIZADOS CON IPDI.....	120
	ANEXO 5. ÁNGULO DE CONTACTO DE PUs SINTETIZADOS CON IPDI	121

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diisocianatos empleados la síntesis de PUs con aplicaciones biomédicas.	8
Tabla 2. Aceites vegetales empleados en la síntesis de PUs.	10
Tabla 3. Porcentaje de puntuación de lesiones del diagnóstico histopatológico.	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aplicaciones médicas de Poliuretanos.	5
Figura 2. Estructura general de Poliuretano.	6
Figura 3. Estructura química de diisocianatos alifáticos y aromáticos comunes en la síntesis de PUs.....	7
Figura 4. Estructuras químicas representativas de triglicéridos de ácidos grasos.	11
Figura 5. Monómeros y aditivos empleados en el proceso de síntesis de PUs.	26
Figura 6. Propiedades mecánicas de PUs sintetizados según el tipo de polioliol y diisocianato.	30
Figura 7. Superficies de repuesta de Esfuerzo máximo de todas las matrices sintetizadas (144 PUs).	34
Figura 8. Superficies de repuesta del porcentaje de elongación de todas las matrices sintetizadas (144 PUs).	35
Figura 9. Espectros de FTIR de PUs sintetizados según el tipo de polioliol y diisocianato.....	36
Figura 10. Termogramas de los Poliuretanos sintetizados según el tipo de polioliol y diisocianato.....	37
Figura 11. Termogramas DSC de PUs sintetizados con el polioliol P.1 y con diferente diisocianato.....	39
Figura 12. Ángulo de contacto de PUs sintetizados según el tipo de polioliol y diisocianato.	40
Figura 13. Superficies de repuesta del porcentaje de elongación de todas las matrices sintetizadas (144 PUs).	42
Figura 14. Porcentaje de absorción de agua durante 72 h.	43
Figura 15. Densidad de los PUs sintetizados con IPDI y con 3% Ch y 15% PCL para cada polioliol empleado.	44
Figura 16. Termogramas DMTA de PUs sintetizados con IPDI según el polioliol.	45

Figura 17. Micrografías FESEM de PUs sintetizados con IPDI a 100x.	47
Figura 18. Porcentaje de degradación de los PUs en diferentes medios.	63
Figura 19. Espectros de FTIR de PUs degradados con medio ácido, básico y enzimático..	64
Figura 20. Micrografías FESEM del PU sintetizado con P.2-15%PCL-3%Ch luego del proceso de degradación en diferentes medios a 10000x.....	65
Figura 21. Porcentaje de viabilidad celular a 24 h.	67
Figura 22. Porcentaje de viabilidad celular a 24 h de Fibroblastos de ratón NIH/3T3 con extractos de los PUs.....	69
Figura 23. Unidades de fluorescencia del resultado del ensayo de viabilidad celular <i>in vitro</i> por el kit LIVE/DEAD durante 48 horas.....	71
Figura 24. Imágenes de microscopía óptica de las tinciones de faloidina (verde) y DAPI (azul) para PUs representativos evaluados sobre fibroblastos L-929 durante 24 h.	72
Figura 25. Porcentaje de inhibición bacteriana de los PUs con diferentes bacterias.	74
Figura 26. Citoquinas antiinflamatorias sin estimulación de LPS.	85
Figura 27. Citoquinas proinflamatorias sin estimulación de LPS.	86
Figura 28. Citoquinas antiinflamatorias con estimulación de LPS.	87
Figura 29. Citoquinas proinflamatorias con estimulación de LPS.	89
Figura 30. Imágenes de tejido de tres de los grupos de ratones al día 30 del experimento..	97
Figura 31. Clasificación de las lesiones presentadas en el análisis histopatológico de los animales.....	99
Figura 32. Descripción macroscópica de lesiones presentadas en los animales.	100

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Artículos científicos derivados de la investigación doctoral

Teniendo en cuenta la reglamentación N°45 del Doctorado en Biociencias de la Universidad de La Sabana sobre los aspectos referidos a los estudiantes, a continuación, se relacionan los artículos publicados en revistas indexadas generados como requisito de producción científica y derivados del proyecto de tesis doctoral:

- ✓ Yomaira L. Uscátegui, Fabián R. Arévalo, Luis E. Díaz, Martha I. Cobo, Manuel F. Valero. Microbial degradation, cytotoxicity and antibacterial activity of polyurethanes based on modified castor oil and polycaprolactone. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2016; 27(18):1860-1879
- ✓ Yomaira L. Uscátegui, Luis E. Díaz, Manuel F. Valero. Actividad antibacteriana, degradación hidrolítica y microbiana y citotoxicidad *in vitro* de poliuretanos sintetizados con polioles derivados del aceite de higuera. *Química Nova*. 2017; 40(2):131-137
- ✓ Yomaira L. Uscátegui, Said J. Arévalo-Alquichire, José A. Gómez-Tejedor, Ana Vallés-Lluch, Luis E. Díaz, Manuel F. Valero. Polyurethane-based bioadhesive synthesized from polyols derived from castor oil (*Ricinus communis*) and low concentration of chitosan. *Journal of Materials Research*. 2017; 32(19):3699-3711
- ✓ Yomaira L. Uscátegui, Luis E. Díaz, Manuel F. Valero. Aplicaciones biomédicas de poliuretanos. *Química Nova*. 2018; 41(4): 434-445
- ✓ Yomaira L. Uscátegui, Luis E. Díaz, Manuel F. Valero. *In vitro* and *in vivo* biocompatibility of polyurethanes synthesized with castor oil polyols as candidate materials for nonabsorbable biomedical sutures. *Journal of Materials Research*. 2019; <https://doi.org/10.1557/jmr.2018.448>
- ✓ Yomaira L. Uscátegui, Luis E. Díaz, José A. Gómez-Tejedor, Ana Vallés-Lluch, Guillermo Vilariño-Feltrer, María A. Serrano, Manuel F. Valero. Candidate Polyurethanes Based on Castor Oil (*Ricinus communis*), with Polycaprolactone Diol and Chitosan Additions, for Use in Biomedical Applications. *Molecules*. 2019; 24(2):237

Artículos científicos colaborativos durante el proceso doctoral

A continuación, se presenta un listado de artículos científicos colaborativos durante el desarrollo del Doctorado en Biociencias:

- ✓ Fabián Arévalo, Yomaira Uscátegui, Manuel Valero, Luis Díaz. Effect of the incorporation of chitosan on the physico-chemical, mechanical properties and biological activity on a mixture of polycaprolactone and polyurethanes obtained from castor oil. *Journal of Biomaterials Applications*. 2016; 31(5):708-720.
- ✓ Said Arévalo-Alquichire, Claudia Ramírez, Laura Andrade, Yomaira Uscategui, Luis E Díaz, José A Gómez-Tejedor, Ana Vallés-Lluch, Manuel F Valero. Polyurethanes from modified castor oil and chitosan: Synthesis, characterization, *in vitro* degradation, and cytotoxicity. *Journal of Elastomers & Plastics*. 2017; 50(5):419-434
- ✓ Ibarra, Jeimmy C.; Uscátegui, Yomaira L.; Arévalo, Fabián R.; Díaz, Luis E.; Valero, Manuel F. Influence of Diisocyanate Chemical Structure on the Properties, Degradation and Cytotoxicity of Polyurethanes Obtained from Castor Oil. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*. 2018; 8(2):279-289

Participación en eventos

- ✓ Yomaira Uscátegui, Fabián Arévalo, Luis Díaz, Manuel Valero. Synthesis and characterization of non-absorbable surgical sutures obtained from polyurethanes synthesized from polyols derived from castor oil, isophorone diisocyanate and poly(ϵ -caprolactone): physico-mechanical properties, degradability and *in vitro* cytotoxicity. Modalidad póster. 10th World Biomaterials Congress. Montréal – Canadá (Mayo de 2016).
- ✓ Yomaira L. Uscátegui, Luis E. Díaz, Manuel F. Valero. Actividad antibacteriana, citotoxicidad y degradación microbiana *in vitro* de suturas no absorbibles tipo poliuretano. Modalidad póster. Bogotá Microbial Meeting. Bogotá – Colombia (Agosto 2016)
- ✓ Fabián Arévalo, Yomaira Uscátegui, Manuel Valero. Efecto de la incorporación de quitosano y policaprolactona sobre las propiedades fisicoquímicas y fisicomecánicas

de poliuretanos obtenidos a partir de aceite de higuera. VIII Congreso internacional de materiales. Modalidad oral. Paipa – Colombia (Octubre de 2015).

- ✓ Yomaira L. Uscátegui, Said J. Arévalo-Alquichire, Luis E. Díaz, Manuel F. Valero. *In vitro* assessment of polyurethanes for non-absorbable surgical sutures synthesized with castor oil (*Ricinus communis*), isophorone diisocyanate, polycaprolactone diol and chitosan. International Congress & Expo on Biotechnology and Bioengineering. Modalidad póster. Valencia – España (Septiembre 2017)
- ✓ Yomaira Uscátegui, Said Arévalo-Alquichire, Luis Díaz, Manuel Valero. *In vitro* assessment of polyurethanes for medical applications synthesized with castor oil and three types of diisocyanate and addition of polycaprolactone diol. IX Congreso Internacional de Materiales. Modalidad presentación oral. Barranquilla – Colombia (Noviembre 2017)
- ✓ Yomaira L. Uscátegui, Guillermo Vilariño-Feltrre, María Herrero, José A. Gómez-Tejedor, Ana Vallés-Lluch, Luis Díaz, Manuel Valero. Candidates for biomedical applications based from castor oil polyurethanes with polycaprolactone diol and chitosan. 29th Annual Meeting of the European Society for Biomaterials. Modalidad póster. Maastricht - Netherlands (Septiembre 2018)

Convocatorias para financiación de proyectos

- ✓ Manuel Valero, Luis Díaz, Yomaira Uscátegui, Fabián Arévalo. Poliuretanos obtenidos a partir de aceite de higuera, diisocianato de L-lisina y Quitosano como candidatos para uso en ingeniería de tejidos blandos. Convocatoria interna de proyectos de investigación. Universidad de La Sabana (2015). Proyecto aprobado para financiación, código de proyecto ING-160-2015.
- ✓ Luis Díaz, Manuel Valero, Yomaira Uscátegui. Poliuretanos sintetizados a partir de aceite de higuera y diisocianatos candidatos en aplicaciones biomédicas como suturas no absorbibles. Convocatoria para proyectos de investigación y desarrollo en Ingeniería, No. 715 – 2015 de Colciencias.
- ✓ Manuel Valero, Luis Díaz, Yomaira Uscátegui, Henry Oliveros. Obtención de suturas no absorbibles tipo poliuretano sintetizadas a partir de polioles derivados del aceite

- de higuera. Convocatoria para proyectos de Ciencia, Tecnología e Innovación en Salud, No. 744-2016 de Colciencias. Proyecto seleccionado en el listado de elegibles.
- ✓ Manuel Valero, Luis Díaz, Yomaira Uscátegui, José Villareal Escobar, Víctor Manuel Deroncel, María Mercedes Zambrano, Patricia del Portillo, Angela Cantillo. Carpo-Pack: Bioempaques activos derivados de la biodiversidad colombiana para la conservación de frutas producidas en el Departamento de Cundinamarca. Convocatoria de innovación entre universidades y empresas para la promoción y validación de productos derivados del aprovechamiento sostenible de la biodiversidad en el departamento de Cundinamarca 2018, No. 803-2018 de Colciencias. Proyecto seleccionado en el listado de elegibles.
 - ✓ Manuel Valero, Luis Díaz, Said J. Arévalo, Yomaira Uscátegui. Evaluación de la viscoelasticidad de poliuretanos sobre la hemodinámica y la respuesta de células endoteliales y de músculo liso en un modelo de perfusión, para el diseño de injertos vasculares. Convocatoria para proyectos de Ciencia, Tecnología e Innovación y su contribución a los retos de país- 2018, No. 808-2018 de Colciencias.

RESUMEN

Los poliuretanos (PUs) son ampliamente utilizados en la preparación de dispositivos médicos debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad cuando se comparan con otros polímeros [Park 2013]. Dentro de las aplicaciones como biomateriales de los PUs se encuentran: suturas, catéteres, corazón artificial, prótesis vasculares, recubrimientos para heridas y revestimiento compatible con la sangre [Rocco 2014]. La aplicación de PUs para una función específica dentro del cuerpo humano depende de propiedades mecánicas, de adhesión, de superficie, biodegradabilidad, entre otras [Chen 2013, St John 2014].

Un grupo de biomateriales que se encuentran en constante desarrollo corresponde a los dispositivos para cierre de heridas donde se localizan las suturas. Hasta la fecha, los materiales de sutura que se emplean con mayor frecuencia en cirugías son polipropileno (no absorbible) y polidioxanona (absorbible) [Simón-Allué 2014]. Diversas investigaciones se han enfocado en introducir mejoras en los materiales de sutura, pero a la fecha aún se presentan inconvenientes [Linderman 2015]. En particular, la tensión generada por el efecto de las suturas suele transferirse al tejido únicamente en los puntos de anclaje [Linderman 2015]. Esto genera elevadas tensiones de los materiales de sutura sobre la cicatrización de la herida, lo que puede generar ruptura de las suturas, necrosis celular, destrucción de los tejidos dentro de los lazos de las suturas, y una eversión o inversión de bordes de la herida [Vogels 2017, Israelsson 2012]. Se sabe que el rendimiento de fricción de las suturas quirúrgicas juega un papel vital en su funcionalidad. Por lo general, la fricción entre las suturas quirúrgicas y los tejidos puede causar inflamación, dolor y un incremento en el tiempo de recuperación [Zhang 2018]. Una solución propuesta por Linderman *et al.* (2015), fue recubrir los materiales de sutura con adhesivos para mejorar la transferencia de carga mecánica y disminuir el riesgo de falla [Linderman 2015]. Esta solución implica desarrollar un estudio sobre los adhesivos que sirvan como recubrimiento de forma óptima y que conserven las propiedades mecánicas de los materiales. Otra solución, planteada por Vogels *et al.* (2017), consistió en utilizar materiales de sutura tipo PU con la capacidad de regular la tensión de la sutura a través de la elasticidad, mejorando el proceso de cicatrización de la herida [Vogels 2017].

Al revisar bibliografía relacionada con el diseño de biomateriales (Capítulo 1), las investigaciones se enfocan en la síntesis y caracterización mecánica, térmica y morfológica de los materiales para que cumplan con las especificaciones dadas para el tipo de aplicación específica. Pocos trabajos se enfocan en evaluar de forma conjunta propiedades mecánicas con propiedades biológicas, como la determinación del carácter degradable y biocompatible de estos materiales en aras de encontrar materiales candidatos en aplicaciones biomédicas. El principal problema consiste en que, al aumentar la funcionalidad del poliol o del diisocianato, aumenta la densidad de entrecruzamiento de los PUs y por ende aumentan las propiedades mecánicas, pero disminuye la degradabilidad y se podría afectar la citotoxicidad, debido a que se modifica la rugosidad y la composición química de la superficie.

Los PUs suelen ser biocompatibles debido a que pueden adaptarse fácilmente al cuerpo humano ya que el enlace uretano es análogo a la unión peptídica que se presenta en proteínas. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue sintetizar PUs a partir de polioles derivados de aceite de higuera para aplicaciones biomédicas como materiales para suturas no-absorbibles con propiedades elásticas y que sean biocompatibles. Se determinó la relación de las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y morfológicas de los materiales para suturas en función de la estructura química de los monómeros empleados para la síntesis, según se describe en el Capítulo 2. El Capítulo 3 corresponde a la determinación de la biodegradabilidad y biocompatibilidad *in vitro* de los materiales para suturas que presenten propiedades fisicoquímicas, mecánicas y morfológicas deseables en función de la estructura de los segmentos y la densidad de entrecruzamiento de los PUs. En el Capítulo 4 se plantea establecer el efecto que presente el/los material(es) para sutura(s) no absorbibles obtenidas, en procesos inflamatorios *in vitro* en comparación con materiales homólogos comercialmente disponibles. Como proceso adicional para complementar esta investigación, se realizó una evaluación *in vivo* de los materiales candidatos como materiales para el diseño de suturas biomédicas (Capítulo 5) llevado a cabo en ratas Wistar en el Bioterio del Instituto Nacional de Salud (Colombia). Al poder correlacionar el comportamiento *in vitro* e *in vivo* de las propiedades mecánicas y biológicas de los materiales sintetizados, se pudo determinar si los PUs pueden ser candidatos en aplicaciones biomédicas como suturas no-absorbibles.

1.1 POLÍMEROS COMO BIOMATERIALES

Históricamente los polímeros se han empleado en diferentes dispositivos de aplicaciones biomédicas. Así por ejemplo, el Polimetacrilato de metilo (PMMA) fue el primer polímero usado como material de prótesis en odontología en el año de 1937. El PMMA también viene siendo utilizado para reparar defectos del cráneo desde 1940, y para la manufactura de lentes intraoculares desde 1949. En 1950, el PMMA fue identificado como cemento óseo en la fijación del fémur. En 1958 se desarrolló el Poli-tetrafluoroetileno (PTFE). En 1940, elastómeros de silicona se usaron para reparar el conducto biliar. En 1950, suturas de dacrón fueron usadas en cirugía. Los geles de silicona para implantes de glándula mamaria se desarrollaron en 1960, y el tereftalato de polietileno (PET) fue identificado clínicamente para uso en prótesis vascular sintética [Subramaniam 2014].

Los polímeros biodegradables han ganado mucha atención hoy en día en el campo de la medicina con el objetivo de buscar nuevos materiales para tratamientos de problemas de salud, debido a sus atractivas propiedades físicas y buena biocompatibilidad [Subramaniam 2014, Zhou 2011, Zia 2008]. Propiedades como facilidad de procesado, durabilidad, funcionalidad superficial, flexibilidad, biocompatibilidad y bioestabilidad los hacen muy interesantes para el desarrollo de materiales para la liberación de fármacos, ingeniería de tejidos y el desarrollo de dispositivos médicos en general [Shelke, N., Nagarale, R., Kumbar 2014]. Un polímero ideal para ser usado en medicina debería exhibir las siguientes propiedades: no inducir inflamación, no generar reacciones tóxicas o enfermedades alérgicas en el cuerpo, tener una buena procesabilidad para diseñar el producto final, fácil de esterilizar, no debe cambiar las propiedades después de la esterilización, biocompatible, durable, funcional y fiable [Domanska 2014].

1.2 PUs EN EL CAMPO BIOMÉDICO

Los poliuretanos (PUs) como familia de polímeros, han ganado importancia en las aplicaciones biomédicas y farmacéuticas debido a propiedades como hemocompatibilidad, resistencia a la biodegradación [Mahkam 2003, Qiu 2013, Shourgashti 2010, Gunatillake

2006, Dulińska-Molak 2013], y propiedades elastoméricas, las cuales pueden ser modificadas por medio de la variación de la composición de las unidades monoméricas y por el tamaño de los bloques de diferentes monómeros dentro de la cadena [St John 2014, Kiran 2012].

Las primeras aplicaciones de PUs en el campo biomédico correspondieron a dispositivos para aplicaciones cardiovasculares desde la década de los ochenta, tales como bolsas de sangre, catéteres vasculares, corazón artificial total y pequeños injertos de acceso vascular y cirugía de *bypass* [Chen 2013]. Estos dispositivos presentaban ventajas a largo plazo, pero después con el tiempo se encontraron inconvenientes en cuanto a la variabilidad de las propiedades mecánicas. Es por esto que se han desarrollado diversos estudios para mejorar la bioestabilidad y las propiedades mecánicas de los PUs por medio de modificaciones químicas [St John 2014].

Posteriormente los PUs fueron ampliamente investigados por ser susceptibles también a la biodegradación, lo que generó un sin número de aplicaciones novedosas y mejoradas de implantación a largo plazo, así como una nueva clase de PUs bioreabsorbibles. Investigaciones recientes se han enfocado en buscar un balance entre biodegradabilidad y biocompatibilidad para lograr materiales versátiles en diversas aplicaciones, para lo cual se hace necesario un amplio estudio de las propiedades mecánicas y de biocompatibilidad de los PUs [Chen 2013].

De acuerdo con una revisión de artículos científicos en la base de datos de *Science Direct* (2017) (Figura 1) sobre las aplicaciones de los PUs en el campo biomédico, se ha observado que las aplicaciones más importantes de dichos materiales son la fabricación de implantes y andamios para la ingeniería de tejidos (37% y 14% respectivamente), seguido de las aplicaciones relacionadas con el sistema cardiovascular, portadores de fármacos y el cierre de heridas. En este último aspecto es donde esta tesis pretende hacer avances significativos.

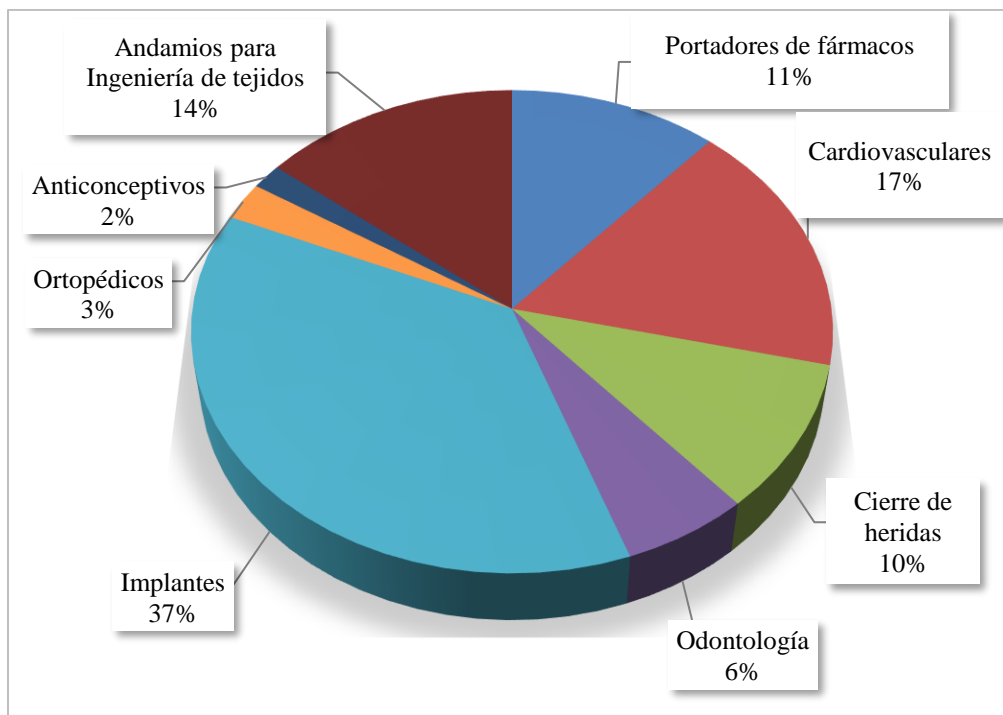


Figura 1. Aplicaciones médicas de Poliuretanos a partir de los datos obtenidos de artículos publicados en *Science Direct* (2017) sobre cada uno de los temas.
Referencia: Datos tomados de la base de datos Science Direct 2017.

1.3 QUÍMICA DE LOS POLIURETANOS

El nombre PU se deriva de la palabra uretano, usada genéricamente para describir los ésteres del ácido carbámico ($H_2N-COOH$). Los PUs representan una clase importante de polímeros termoplásticos, cuyas propiedades mecánicas, térmicas, y químicas pueden ser modificadas desde la síntesis [Zia 2007]. El proceso de síntesis consiste en la reacción de un poliisocianato con un poliol o cualquier especie donadora de hidrógeno, en presencia de otros reactivos como agentes entrecruzantes, extensores de cadena, agentes de relleno, entre otros [Gunatillake 2006, Chashmejahanbin 2014, Vroman 2009]. Los PUs (copolímeros de bloque segmentados) están conformados por segmentos duros o rígidos, y suaves o blandos [Bat 2014], como se observa en la Figura 2. Los segmentos, duros y blandos se encuentran conectados por medio de enlaces uretano. El segmento duro proporciona los entrecruzamientos físicos dentro de la matriz del segmento blando [Murray 2013]. Los métodos de síntesis de PUs se pueden clasificar según el tipo de medio que se utiliza, una masa o polimerización en disolución, o según las etapas que son necesarias para realizar la síntesis, una o más etapas [Caracciolo 2015]. La primera etapa es una reacción que implica

la nivelación final de los segmentos blandos macrodiol (poliéter, poliéster, policarbonato, o polisiloxano) con diisocianato para formar un pre-polímero, y la segunda etapa consiste en el acoplamiento del pre-polímero con una cadena de bajo peso molecular, generalmente corresponde a un extensor de cadena, un diol o una diamina. El segmento duro generalmente se refiere a la combinación del extensor de cadena y los componentes de diisocianato, mientras que los segmentos blandos se refieren a dioles poliméricos [He 2012].

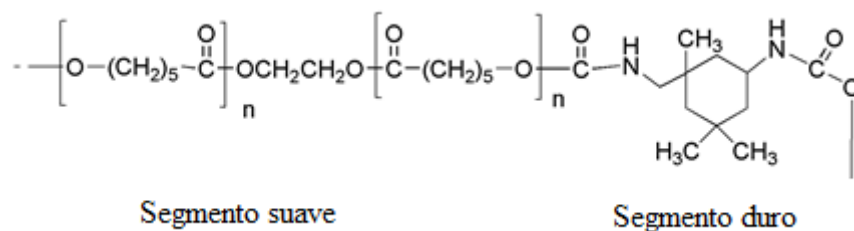


Figura 2. Estructura general de Poliuretano.

Tomado de Uscátegui *et al.* (2016) [Uscátegui 2016]

Como ejemplo de la influencia que tiene el método de síntesis en su posterior aplicación, se puede nombrar el artículo de Zieleniewska *et al.* (2014) quienes sintetizaron PUs utilizando el método del prepolímero en masa para diseñar andamiajes microporosos que imitan tejidos óseos destinados a la aplicación en ingeniería de tejidos y emplearon como polirol el aceite de colza. Los autores encontraron que este método era adecuado para el diseño de materiales porosos con gran potencial en la ingeniería de tejidos [Zieleniewska 2014].

1.4 MONÓMEROS

1.4.1 Diisocianatos

El isocianato con grupo funcional NCO constituye parte del segmento duro del PU [Ng 2017]. Los diisocianatos empleados en la síntesis de PUs se pueden clasificar en alifáticos y aromáticos, según se observa en la Figura 3. La selección del tipo de diisocianato a utilizar influye directamente sobre las propiedades mecánicas y biológicas del material [Ionescu 2016]. En la síntesis de PUs son más usados los diisocianatos aromáticos dada la elevada reactividad que presentan. Ionescu *et al.* (2016) sintetizaron espumas de PU con tres tipos de diisocianatos: alifático, cicloalifático y aromático. Con el diisocianato m-xileno, diisocianato alifático, se sintetizaron elastómeros de PU gomosos. Al utilizar 4`4-diisocianato de

diciclohexilmetano (cicloalifático), se obtuvieron materiales moderadamente rígidos. Y con el diisocianato de difenilmetano (aromático) se sintetizaron PUs amorfos rígidos con propiedades mecánicas mejoradas comparadas con los otros materiales sintetizados. Los autores encontraron que el proceso de síntesis con los diisocianatos alifáticos es más complejo comparado con el aromático, debido a la baja reactividad del primero [Ionescu 2016].

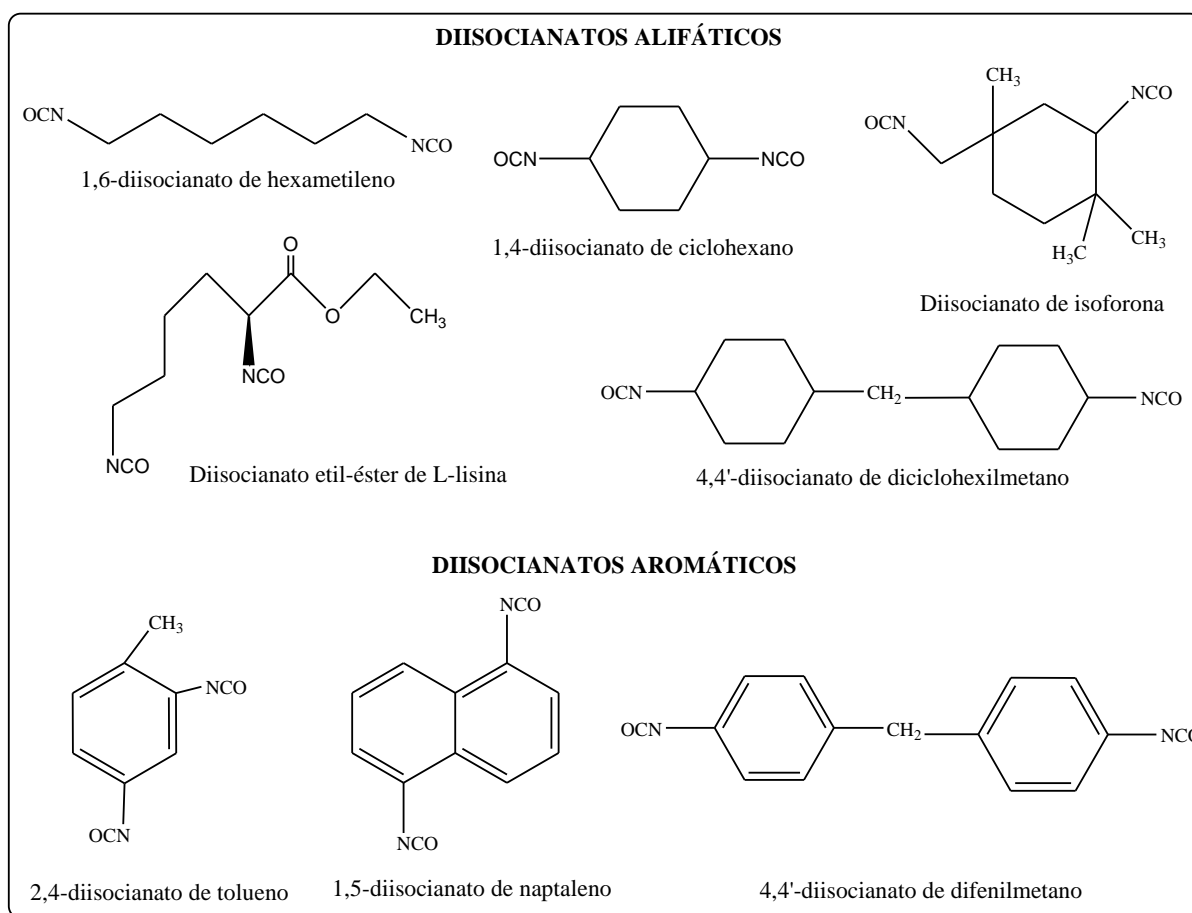


Figura 3. Estructura química de diisocianatos alifáticos y aromáticos comunes en la síntesis de PUs.
Referencias: [Zhang 2017, Basterretxea 2016, Mangeon 2017]

Actualmente existen investigaciones enfocadas en el efecto tóxico que pueden presentar los monómeros utilizados en la síntesis de PUs, como los diisocianatos, donde se indica que los diisocianatos aromáticos pueden presentar diaminas carcinogénicas y mutagénicas tras el proceso de degradación [Basterretxea 2016, Kucinska-lipka 2017, Laube 2017]. Esta es una de las razones por las cuales los materiales sintetizados con diisocianatos aromáticos se

emplean por lo general en el diseño de biomateriales para aplicaciones permanentes en el organismo, donde no se presenten productos de degradación [Caracciolo 2015]. De esta forma, en la actualidad los diisocianatos que han ganado interés en el diseño de PUs para el campo biomédico son los alifáticos para evitar los posibles efectos tóxicos a largo plazo generados por los aromáticos [Ng 2017]. En la Tabla 1 se presenta un listado de diisocianatos empleados en el diseño de biomateriales.

Tabla 1. Diisocianatos empleados la síntesis de PUs con aplicaciones biomédicas.

Diisocianato	Aplicación	Evaluación biológica	Referencia
4,4'-diisocianato de dicitclohexilmetano	Materiales para uso en medicina regenerativa	PUs biocompatibles, hemocompatibles y con actividad antimicrobiana contra <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	[Kucinska-lipka 2017]
Diisocianato de hexametileno	Injertos vasculares	Ensayo <i>in vitro</i> colorimétrico XTT con células endoteliales de la vena umbilical por 12 y 14 horas. Ensayos <i>in vivo</i> a largo plazo (12 meses) en modelo murino.	[Bergmeister 2015]
Diisocianato de hexametileno	Administración de fármacos para la terapia de cáncer de mama	Evaluación <i>in vitro</i> por medio del ensayo MTT con células MCF-7 (adenocarcinoma de mama), L929 (fibroblasto de ratón) and BT474 (carcinoma de mama) y ensayos <i>in vivo</i> sobre ratones albinos suizos.	[Kumar 2017]
Diisocianato de hexametileno, diisocianato de isofozona, diisocianato de L-lisina, entre otros	Materiales biocompatibles y hemocompatibles	Evaluados <i>in vitro</i> por medio de adhesión de plaquetas, adsorción de proteínas y proliferación celular.	[Basterretxea 2016]
4,4'-diisocianato de dicitclohexametileno y 1,6-diisocianato de hexametileno	Materiales no tóxicos que presentan adhesión celular y proliferación	Evaluados <i>in vitro</i> por medio del ensayo MTT sobre fibroblastos de ratón L929.	[Fernández-d'Arlas 2015]
1,6-diisocianato de hexametileno	PUs para aplicaciones en ingeniería de tejidos como andamios compuestos de nanotubos de oro	Mejoran la unión celular sobre el material polimérico.	[Ganji 2014]

1.4.2 Polioles

En aras de buscar un desarrollo sostenible durante la síntesis de PUs, en la actualidad las investigaciones se enfocan en remplazar las materias primas provenientes de la petroquímica [Ng 2017, Jutrzenka Trzebiatowska 2018]. La utilización de materias renovables hace parte de los doce principios de la química verde postulados por Paul Anastas y John Warner [Zhang 2017]. La tendencia es emplear triglicéridos de ácidos grasos provenientes de aceites vegetales de diferentes semillas como maíz, soya, girasol, palma, higuera, entre otros [Ismail 2011, Calvo-Correas 2015, Ng 2017], según se observa en la Tabla 2. Los triglicéridos de ácidos grasos se caracterizan por presentar variadas estructuras químicas y sitios reactivos que permiten la modificación del aceite generando de esta forma monómeros con diferentes funcionalidades [Maisonneuve 2016]. Entre sus ventajas se puede destacar que son económicos, no tóxicos, abundantes y contienen grupos hidroxilos secundarios y triglicéridos de ácidos grasos [Bakhshi 2013, Das 2013, Firdaus 2014, Gao 2012, Miao 2014, Thakur 2013, Valério 2013, Saciloto 2013].

Los aceites vegetales se componen principalmente de triglicéridos de ácidos grasos de cadenas largas con insaturaciones como dobles enlaces [Ismail 2011], como se observa en la Figura 4. La composición de los ácidos grasos depende del tipo de aceite vegetal [Zhang 2017]. Los triglicéridos son abundantes, renovables, biodegradables y se han convertido en una fuente alternativa en la síntesis de materiales poliméricos [Zhang 2017, Madra 2009]. Los aceites vegetales se pueden modificar para incrementar la funcionalidad del poliol por medio de la adición de grupos hidroxilo, haciendo uso de las insaturaciones presentes en la estructura [Pfister 2011]. Esto se realiza mediante diversas técnicas como alcoholisis, epoxidación, transesterificación, entre otras [Petrović 2017, Pfister 2011, Jayavani 2017, Lligadas 2010].

Uno de los aceites que se ha utilizado recientemente es el aceite de higuera (*Ricinus communis*) cuyo contenido de ácido ricinoléico es de aproximadamente el 90% (peso/peso). El aceite de higuera contiene grupos hidroxilo en la cadena que reaccionan con isocianatos polifuncionales para formar PUs con diferentes propiedades morfológicas, mecánicas (buena flexibilidad y elasticidad), entre otras, gracias a la cadena larga de ácidos grasos presentes [dos Santos 2012, Luo 2011, Miléo 2011, Valero 2012, Valero-Valdivieso 2013].

Tabla 2. Aceites vegetales empleados en la síntesis de PUs.

Nombre de aceite	Generalidades	Referencia
Aceite de linaza	Índice hidroxilo: 112,1 mg KOH g ⁻¹ . Puede reaccionar con diisocianato de tolueno y diisocianato de hexametileno en la síntesis de PU.	[Madra 2009]
Aceite de palma	Índice hidroxilo: 155 mg KOH g ⁻¹ .	[Pillai 2016]
Aceite de soya	Índice hidroxilo entre 165-178 mg KOH g ⁻¹ y funcionalidad entre 2,59 y 2,92. Esterificado con glicerol. Se sintetizó con diisocianato de difenilmetano para generar el PU.	[Ismail 2011]
Aceite de higuera	Sintetizado con diisocianato de etil-éster de L-lisisna. Viabilidad celular evaluada sobre fibroblastos de ratón L-929 durante 24, 48 y 72 horas. Materiales con memoria de forma.	[Calvo-Correas 2015]
Aceite de linaza	Síntesis de PUs. Materiales con actividad antimicrobiana contra <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .	[Sharmin 2013]
Aceite de soya y aceite de higuera	Síntesis de PUs con memoria de forma. Materiales biodegradables y biocompatibles. Índice hidroxilo entre 44 y 99 mg KOH g ⁻¹ .	[Petrović 2017]
Aceite de colza	Índice hidroxilo de 127,5 mg KOH g ⁻¹ .	[Zieleniewska 2014]
Aceite de palma	Índice hidroxilo: 115,72 mg KOH g ⁻¹ . Síntesis con diisocianato de isofoforona. Materiales con potencial para aplicaciones biomédicas como ingeniería de tejidos blandos y rígidos.	[Ng 2017]
Aceite de higuera	Redes poliméricas interpenetradas con buenas propiedades mecánicas. Sintetizado con diisocianato de isofoforona. Índice hidroxilo: 163 mg KOH g ⁻¹ . Por medio de transesterificación por trietanolamina, el índice hidroxilo incrementó a 321 mg KOH g ⁻¹ .	[Dave 2017]
Aceite de jatropha	Luego de una epoxidación se obtiene un índice hidroxilo entre 200 y 220 mg KOH g ⁻¹ . PUs sintetizados con diisocianato de difenilmetano.	[Mustapa 2016]
Aceite de algodón	Por medio de transesterificación se convierte en polioles con índices hidroxilo entre 98.87 y 192.33 mg KOH g ⁻¹ . PUs con buenas propiedades mecánicas, químicas y de resistencia.	[Patil 2017]

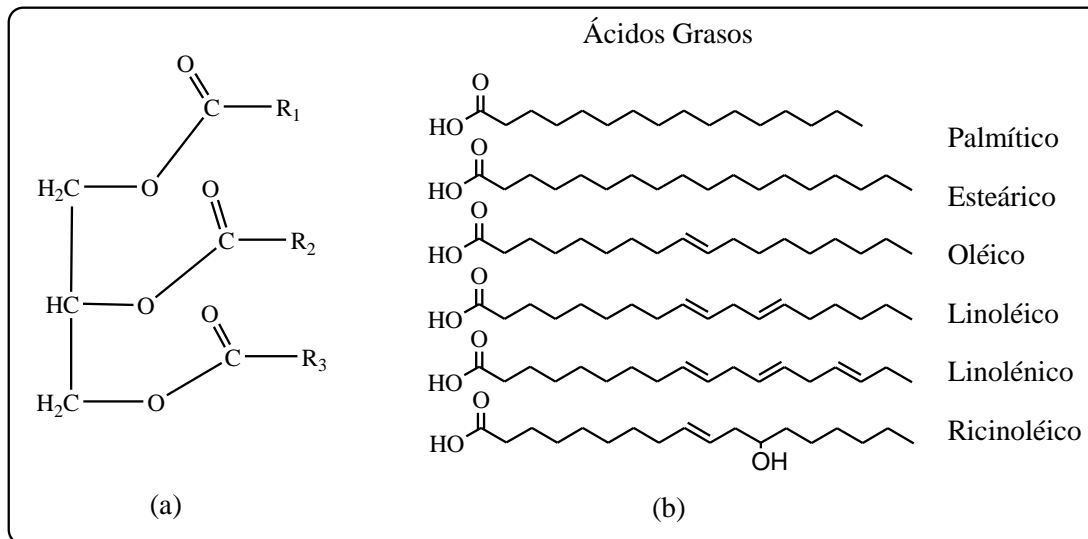


Figura 4. Estructuras químicas representativas de triglicéridos de ácidos grasos.

(a) Estructura de triglicérido (R_1 , R_2 , y R_3 representan cadenas de ácidos grasos); (b) Ácidos grasos comunes presentes en los aceites vegetales. *Referencias:* [Zhang 2017, Calvo-Correas 2015, Madra 2009, Pfister 2011, Juita 2012]

1.4.3 Aditivos

Una estrategia empleada en el diseño de biomateriales consiste en funcionalizar o reforzar polímeros sintéticos con la adición de compuestos orgánicos o inorgánicos, de fuentes naturales o sintéticas, con el fin de obtener materiales con diversas propiedades, como propiedades antibacterianas, mejoras sobre la biocompatibilidad, incremento de la biodegradabilidad, entre otras [Zhang 2017, Javaid 2018]. Entre los aditivos empleados en los procesos de síntesis de PUs, en este trabajo se han seleccionado los que se relacionan a continuación.

Quitosano: es un polisacárido derivado de la desacetilación parcial de la quitina, principal componente del exoesqueleto de crustáceos e insectos y corresponde al material biosintetizado más abundante [Arshad 2018]. El quitosano tiene un grupo amino primario y dos grupos hidroxilos libres por cada unidad de glucosa, lo que es beneficioso para aplicaciones biomédicas [Usman 2016]. Gracias al carácter de biopolímero catiónico, el quitosano no es tóxico, es biodegradable, biocompatible y se caracteriza por poseer actividad antimicrobiana, propiedades antigénicas y de regeneración tisular. Estas propiedades le permiten su uso en áreas como la medicina, la ingeniería de tejidos y sistema de liberación de fármacos, entre otras [Wu 2018].

Policaprolactona diol: es un poliéster alifático lineal que se obtiene por medio de la polimerización de apertura de anillo de ϵ -caprolactona y se caracteriza por ser biodegradable [Chen 2018]. Este polímero se emplea en diversas aplicaciones biomédicas, por ejemplo en ingeniería de tejido óseo, liberación de fármacos, entre otras, gracias a su biocompatibilidad, bioabsorbibilidad y propiedades mecánicas [Chen 2018, Kotula 2017]. La policaprolactona tiene facilidad para combinarse con otros polímeros o actuar como material de relleno. Esta facilidad permite modificar sus propiedades físicas y su estabilidad estructural ante procesos de degradación [Kotula 2017].

La selección de los aditivos mencionados para este trabajo se dio por las propiedades de biocompatibilidad que presentan y porque se han utilizado en aplicaciones como apósitos para heridas, suturas quirúrgicas, andamios en ingeniería de tejidos, entre otros [Wu 2018].

1.5 SUTURAS BIOMÉDICAS

Con el desarrollo de filamentos de plásticos sintéticos y las mejoras en las técnicas quirúrgicas, a finales de 1960, comienza el desarrollo de materiales de sutura. Es así como por ejemplo en 1970 surgen las suturas absorbibles a partir de Ácido Poliglicólico [Scott Taylor 2013].

Las suturas quirúrgicas son una de las tres principales categorías de biomateriales para cerrar heridas junto con grapadoras o clips de ligadura y adhesivos de tejidos. Según la definición de la Norma Técnica Colombiana 2267 (Icontec, 2003), la sutura quirúrgica es una hebra o conjunto de hebra y aguja, fabricados de diferentes materiales, utilizados para dos finalidades: aproximar tejidos o ligar. El principal factor para identificar el hilo de la sutura es la capacidad de absorción (materiales reabsorbibles o biodegradables). Es así como se dividen en absorbibles y no absorbibles. Las suturas absorbibles son capaces de ser absorbidas por el tejido vivo de mamíferos, pero pueden ser tratadas para modificar su absorción, y las no absorbibles resisten efectivamente la digestión enzimática o la absorción en el tejido vivo [Simón-Allué 2014]. En el pasado, las suturas absorbibles se definían como aquellas que presentaban una pérdida importante de la fuerza tensil dentro de un período de dos meses, pero los avances actuales en materiales han diseñado suturas absorbibles que pueden mantener la fuerza medible durante seis meses o más. Las suturas absorbibles pierden fuerza mucho antes de perder masa; puede tardar meses o años después de que la sutura

pierde fuerza para ser absorbida por completo [Scott Taylor 2013]. Las suturas absorbibles, como la polidioxanona y el poligliconato, son generalmente usadas para cerrar las estructuras más internas de la epidermis. Las suturas no absorbibles, como el nylon y polipropileno, retienen su fuerza tensil por más de 2 meses, son relativamente no reactivas y son apropiadas para cerrar las laceraciones más externas. Es necesario retirar este tipo de suturas.

El polipropileno y la polidioxanona son los ejemplos más comunes de sutura no absorbible y absorbible, respectivamente. Estos dos tipos de suturas son empleados en cierres de laparotomía [Simón-Allué 2014]. Las características principales de las suturas de polidioxanona son: entre 450-560 MPa de resistencia límite, 30-38% de alargamiento de rotura, 1,2-1,7 GPa de módulo de Young y presentan una funcionalidad de 4-6 semanas. De igual forma las características principales de las suturas de polipropileno son: entre 410-760 MPa de resistencia límite, 30-60% de alargamiento de rotura, 2,1-4,1 GPa de módulo de Young, con una funcionalidad permanente y su manufactura es económica [Wolf 2015]. Este tipo de suturas son usualmente esterilizadas con óxido de etileno y ocasionalmente con radiación de alta energía [Scott Taylor 2013].

Baimark, *et al.* (2005) sintetizaron y caracterizaron suturas no absorbibles empleando la técnica del *melt-spinning* de un copolímero en bloque de poli(L-láctido-co- ϵ -caprolactona) logrando un balance entre las propiedades mecánicas y la biodegradabilidad y a su vez encontraron buena correlación estructura-propiedades de la sutura monofilamento obtenida en la investigación [Baimark 2005]. Reddy *et al.* (2010) optimizaron parámetros en el proceso de *spinning* para obtener fibras de PU empleando la técnica del hilado en seco. Los autores determinaron diferentes variables y llegaron a concluir que al modificar las variables se puede mejorar la suavidad y recuperación elástica de las fibras [Reddy 2010]. Simón-Allué *et al.* evaluaron el comportamiento mecánico de cuatro tipos de suturas. Una de estas suturas era un PU comercial (*Assuplus*®) y encontraron que este polímero es adecuado para el cierre de la pared abdominal debido a su comportamiento mecánico comparado con polipropileno y la polidioxanona [Simón-Allué 2014].

Vogels *et al.* (2017) afirman que una de las complicaciones al utilizar suturas para cerrar heridas consiste en el efecto generado por tensiones elevadas de los materiales de sutura sobre la cicatrización de la herida, debida a la necrosis y la destrucción de los tejidos dentro de los lazos de las suturas. Una posible solución es utilizar materiales de sutura con la capacidad de

regular la tensión de la sutura, a través de la elasticidad; esto podría mejorar la cicatrización de heridas. Es así como estos autores desarrollaron hilos de PUs y luego realizaron una evaluación *in vivo* de la respuesta celular y los cambios funcionales en la tensión de la sutura [Vogels 2017]. El seguimiento de biocompatibilidad se realizó durante 7 y 21 días luego de implantar la sutura y no se presentaron señales de infección de la herida ni anomalías debidas al material implantado. Con respecto a la tensión de las suturas se realizó una comparación con suturas de polipropileno y durante el primer minuto de ensayo se observó que las suturas de polipropileno presentaban un pico de tensión mayor que las de PU, pero luego de ese tiempo esas diferencias desaparecieron, comportándose bajo la misma tendencia. Los autores afirman que los hilos de PUs generarían una menor constricción y probablemente menos necrosis, por lo que proponen como material candidato para el desarrollo de suturas, el uso de PUs gracias a sus diversas propiedades [Vogels 2017].

Es así como en el presente proyecto se desarrollaron materiales para suturas no absorbibles tipo PU con polioles derivados del aceite de higuera con propiedades elásticas adecuadas. Se buscaba responder la siguiente pregunta: ¿Cuál es la formulación adecuada para sintetizar poliuretanos a partir de polioles derivados de aceite de higuera modificados químicamente como materiales para suturas no absorbibles, que presenten una buena correlación entre las propiedades mecánicas y biológicas *in vitro*, en función de la estructura de los monómeros empleados?

1.6 CONCLUSIONES

Los PUs han tenido un impacto significativo en el avance de la búsqueda de materiales para las diversas aplicaciones biomédicas, y permanecerán siendo objeto de estudio en las siguientes generaciones. La biodegradabilidad de los PUs y el resto de propiedades característicos de los mismos, son los atractivos para seguir investigaciones en el campo biomédico y de esa forma superar las desventajas que aún presentan estos materiales. Con los materiales que se planteó obtener durante esta investigación se espera que sean aptos para el campo biomédico, debido a la integración de ciencias actuales, que implica la medicina, la biología, la ciencia de los materiales e ingeniería, con lo que se tiene un mayor conocimiento sobre la relación de interacción de los biomateriales con la respuesta biológica y demás propiedades de los órganos humanos. Se debe resaltar la importancia de buscar una

correlación entre las propiedades mecánicas y las propiedades biológicas desde el proceso de síntesis de los PUs que permitan mantener la biocompatibilidad requerida para los dispositivos médicos. De esta forma, el futuro de la búsqueda de PUs funcionales biocompatibles y biodegradables está directamente relacionado con la formación de equipos multidisciplinares para llevar a cabo las investigaciones necesarias.

1.7 REFERENCIAS

- Arshad, N., Zia, K. M., Jabeen, F., Anjum, M. N., Akram, N., & Zuber, M. (2018). Synthesis, characterization of novel chitosan based water dispersible polyurethanes and their potential deployment as antibacterial textile finish. *International Journal of Biological Macromolecules*, *111*, 485–492.
- Baimark, Y., Molloy, R., Molloy, N., Siripitayananon, J., Punyodom, W., & Sriyai, M. (2005). Synthesis, characterization and melt spinning of a block copolymer of L-lactide and ϵ -caprolactone for potential use as an absorbable monofilament surgical suture. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *16*(8), 699–707.
- Bakhshi, H., Yeganeh, H., Mehdipour-Ataei, S., Shokrgozar, M. A., Yari, A., & Saedi-Eslami, S. N. (2013). Synthesis and characterization of antibacterial polyurethane coatings from quaternary ammonium salts functionalized soybean oil based polyols. *Materials Science and Engineering C*, *33*(1), 153–64.
- Basterretxea, A., Haga, Y., Sanchez-Sanchez, A., Isik, M., Irusta, L., Irusta, L., ... Sardon, H. (2016). Biocompatibility and hemocompatibility evaluation of polyether urethanes synthesized using DBU organocatalyst. *European Polymer Journal*, *84*, 750–758.
- Bat, E., Zhang, Z., Feijen, J., Grijpma, D. W., & Poot, A. a. (2014). Biodegradable elastomers for biomedical applications and regenerative medicine. *Regenerative Medicine*, *9*(3), 385–98.
- Bergmeister, H., Seyidova, N., Schreiber, C., Strobl, M., Grasl, C., Walter, I., ... Schima, H. (2015). Biodegradable, thermoplastic polyurethane grafts for small diameter vascular replacements. *Acta Biomaterialia*, *11*, 104–113.
- Calvo-Correas, T., Santamaria-Echart, A., Saralegi, A., Martin, L., Valea, Á., Corcuera, M. A., & Eceiza, A. (2015). Thermally-responsive biopolyurethanes from a biobased diisocyanate. *European Polymer Journal*, *70*, 173–185.

- Caracciolo, P. C., & Abraham, G. A. (2015). Poliuretanos biomédicos: síntesis, propiedades, procesamiento y aplicaciones. In H. Sousa, M. Braga, & A. Sosnik (Eds.), *Biomateriales aplicados al diseño de sistemas terapéuticos avanzados* (pp. 147–181). Universidad de Coimbra.
- Chashmejahanbin, M. R., Daemi, H., Barikani, M., & Salimi, A. (2014). Noteworthy impacts of polyurethane-urea ionomers as the efficient polar coatings on adhesion strength of plasma treated polypropylene. *Applied Surface Science*, *317*, 688–695.
- Chen, H., Yu, X., Zhou, W., Peng, S., & Zhao, X. (2018). Highly toughened polylactide (PLA) by reactive blending with novel polycaprolactone-based polyurethane (PCLU) blends. *Polymer Testing*, *70*(July), 275–280.
- Chen, Q., Liang, S., & Thouas, G. a. (2013). Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, *38*(3–4), 584–671.
- Das, B., Konwar, U., Mandal, M., & Karak, N. (2013). Sunflower oil based biodegradable hyperbranched polyurethane as a thin film material. *Industrial Crops and Products*, *44*, 396–404.
- Dave, V. J., & Patel, H. S. (2017). Synthesis and characterization of interpenetrating polymer networks from transesterified castor oil based polyurethane and polystyrene. *Journal of Saudi Chemical Society*, *21*, 18–24.
- Domanska, A., & Boczkowska, A. (2014). Biodegradable polyurethanes from crystalline prepolymers. *Polymer Degradation and Stability*, *108*, 175–181.
- dos Santos, D., Tavares, L., & Batalha, G. (2012). Mechanical and physical properties investigation of polyurethane material obtained from renewable natural source. *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*, *54*(2), 211–217.
- Dulińska-Molak, I., Lekka, M., & Kurzydłowski, K. J. (2013). Surface properties of polyurethane composites for biomedical applications. *Applied Surface Science*, *270*, 553–560.
- Fernández-d'Arlas, B., Alonso-varona, A., Palomares, T., Corcuera, M. A., & Eceiza, A. (2015). Studies on the morphology, properties and biocompatibility of aliphatic diisocyanate-polycarbonate polyurethanes. *Polymer Degradation and Stability*, *122*, 153–160.
- Firdaus, F. E. (2014). Synergization of silicone with developed crosslinking to soy-based

- polyurethane foam matrix. *Materials Science and Engineering*, 58, 012023.
- Ganji, Y., Kasra, M., Salahshour, S., & Bagheri, M. (2014). Synthesis and characterization of gold nanotube/nanowire–polyurethane composite based on castor oil and polyethylene glycol. *Materials Science and Engineering C Engineering C*, 42, 341–349.
- Gao, Z., Peng, J., Zhong, T., Sun, J., Wang, X., & Yue, C. (2012). Biocompatible elastomer of waterborne polyurethane based on castor oil and polyethylene glycol with cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, 87(3), 2068–2075.
- Gunatillake, P., Mayadunne, R., & Adhikari, R. (2006). Recent developments in biodegradable synthetic polymers. *Biotechnology Annual Review*, 12(06), 301–47.
- He, W., & Benson, R. (2012). Polymeric biomaterials. In S. Ebnesajjad (Ed.), *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics: Properties, Processing and Applications* (pp. 87–107). Elsevier.
- Ionescu, M., Radojčić, D., Wan, X., Shrestha, M. L., Petrović, Z. S., & Upshaw, T. A. (2016). Highly functional polyols from castor oil for rigid polyurethanes. *European Polymer Journal*, 84, 736–749.
- Ismail, E. A., Motawie, A. M., & Sadek, E. M. (2011). Synthesis and characterization of polyurethane coatings based on soybean oil–polyester polyols. *Egyptian Journal of Petroleum*, 20, 1–8.
- Javid, M. A., Khera, R. A., Zia, K. M., Saito, K., Bhatti, I. A., & Asghar, M. (2018). Synthesis and characterization of chitosan modified polyurethane bio-nanocomposites with biomedical potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 375–384.
- Jayavani, S., Sunanda, S., Varghese, T. O., & Nayak, S. K. (2017). Synthesis and characterizations of sustainable polyester polyols from non-edible vegetable oils: thermal and structural evaluation. *Journal of Cleaner Production*, 162, 795–805.
- Juita, Długogorski, B. Z., Kennedy, E. M., & Mackie, J. C. (2012). Low temperature oxidation of linseed oil: a review. *Fire Science Reviews*, 1–36.
- Jutrzenka Trzebiatowska, P., Santamaria Echart, A., Calvo Correias, T., Eceiza, A., & Datta, J. (2018). The changes of crosslink density of polyurethanes synthesised with using recycled component. Chemical structure and mechanical properties investigations. *Progress in Organic Coatings*, 115(November 2017), 41–48.

- Kiran, S., James, N. R., Jayakrishnan, A., & Joseph, R. (2012). Polyurethane thermoplastic elastomers with inherent radiopacity for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, *100*(12), 3472–3479.
- Kotula, A. P., Snyder, C. R., & Migler, K. B. (2017). Determining conformational order and crystallinity in polycaprolactone via Raman spectroscopy. *Polymer*, *117*, 1–10.
- Kucinska-lipka, J., Gubanska, I., Strankowski, M., Cie, H., Filipowicz, N., & Janik, H. (2017). Synthesis and characterization of cycloaliphatic hydrophilic polyurethanes, modified with L-ascorbic acid, as materials for soft tissue regeneration. *Materials Science and Engineering C*, *75*, 671–681.
- Kumar, A., Lale, S. V., Alex, M. R. A., Choudhary, V., & Koul, V. (2017). Folic acid and trastuzumab conjugated redox responsive random multiblock copolymeric nanocarriers for breast cancer therapy: in-vitro and in-vivo studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *149*, 369–378.
- Laube, T., Weisser, J., Berger, S., Börner, S., Bischoff, S., Schubert, H., ... Schnabelrauch, M. (2017). In situ foamable, degradable polyurethane as biomaterial for soft tissue repair. *Materials Science and Engineering C*, *78*, 163–174.
- Lligadas, G., Ronda, J. C., Galià, M., & Cádiz, V. (2010). Plant oils as platform chemicals for polyurethane synthesis: current state-of-the-art. *Biomacromolecules*, *11*, 2825–2835.
- Luo, Z., Shi, Y., Zhao, D., & He, M. (2011). Synthesis of epoxidated castor oil and its effect on the properties of waterborne polyurethane. *Procedia Engineering*, *18*, 37–42.
- Madra, H., Tantekin-Ersolmaz, B., & Guner, F. S. (2009). Monitoring of oil-based polyurethane synthesis by FTIR-ATR. *Polymer Testing*, *28*, 773–779.
- Mahkam, M., & Sharifi-Sanjani, N. (2003). Preparation of new biodegradable polyurethanes as a therapeutic agent. *Polymer Degradation and Stability*, *80*(2), 199–202.
- Maisonneuve, L., Chollet, G., Grau, E., & Cramail, H. (2016). Vegetable oils: a source of polyols for polyurethane materials. *Oilseeds & Fats Crops and Lipids*, *23*(5), D508.
- Mangeon, C., Renard, E., Thevenieau, F., & Langlois, V. (2017). Networks based on biodegradable polyesters: An overview of the chemical ways of crosslinking. *Materials Science and Engineering C*, *80*, 760–770.
- Miao, S., Wang, P., Su, Z., & Zhang, S. (2014). Vegetable-oil-based polymers as future polymeric biomaterials. *Acta Biomaterialia*, *10*(4), 1692–1704.

- Miléo, P. C., Mulinari, D. R., Baptista, C. a. R. P., Rocha, G. J. M., & Gonçalves, a. R. (2011). Mechanical Behaviour of Polyurethane from Castor oil Reinforced Sugarcane Straw Cellulose Composites. *Procedia Engineering*, *10*, 2068–2073.
- Murray, K. A., Kennedy, J. E., McEvoy, B., Vrain, O., Ryan, D., Cowman, R., & Higginbotham, C. L. (2013). The influence of electron beam irradiation conducted in air on the thermal, chemical, structural and surface properties of medical grade polyurethane. *European Polymer Journal*, *49*(7), 1782–1795.
- Mustapa, S. R., Aung, M. M., Ahmad, A., Mansor, A., & TianKhoon, L. (2016). Preparation and characterization of Jatropha oil-based Polyurethane as non-aqueous solid polymer electrolyte for electrochemical devices. *Electrochimica Acta*, *222*, 293–302.
- Ng, W. S., Lee, C. S., Chuah, C. H., & Cheng, S. F. (2017). Preparation and modification of water-blown porous biodegradable polyurethane foams with palm oil-based polyester polyol. *Industrial Crops and Products*, *97*, 65–78.
- Patil, C. K., Rajput, S. D., Marathe, R. J., Kulkarni, R. D., Phadnis, H., Sohn, D., ... Gite, V. V. (2017). Synthesis of bio-based polyurethane coatings from vegetable oil and dicarboxylic acids. *Progress in Organic Coatings*, *106*, 87–95.
- Petrović, Z. S., Milic, J., Zhang, F., & Ilavsky, J. (2017). Fast-responding bio-based shape memory thermoplastic polyurethanes. *Polymer*, *121*, 26–37.
- Pfister, D. P., Xia, Y., & Larock, R. C. (2011). Recent advances in vegetable oil-based polyurethanes. *ChemSusChem*, *4*(6), 703–17.
- Pillai, P. K. S., Li, S., Bouzidi, L., & Narine, S. S. (2016). Metathesized palm oil polyol for the preparation of improved bio-based rigid and flexible polyurethane foams. *Industrial Crops & Products*, *83*, 568–576.
- Qiu, H., Li, D., Chen, X., Fan, K., Ou, W., Chen, K. C., & Xu, K. (2013). Synthesis, characterizations, and biocompatibility of block poly(ester-urethane)s based on biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) (P3/4HB) and poly(ϵ -caprolactone). *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, *101*(1), 75–86.
- Reddy, R., Deopura, B. L., & Joshi, M. (2010). Dry-jet-wet spun polyurethanes fibers. I. Optimization of the spinning parameters. *Journal of Applied Polymer Science*, *118*(4), 2291–2303.
- Saciloto, T. R., Cervini, P., & Cavalheiro, É. T. G. (2013). Simultaneous voltammetric

- determination of acetaminophen and caffeine at a graphite and polyurethane screen-printed composite electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24(9), 1461–1468.
- Scott Taylor, M., & Shalaby, S. W. (2013). *Sutures. Biomaterials Science* (Third Edit). Elsevier.
- Sharmin, E., Zafar, F., Akram, D., & Ahmad, S. (2013). Plant oil polyol nanocomposite for antibacterial polyurethane coating. *Progress in Organic Coatings*, 76, 541–547.
- Shelke, N., Nagarale, R., Kumbar, S. (2014). Polyurethanes. In *Natural and Synthetic Biomedical Polymers* (pp. 123–144). Saint Louis, MO, USA: Elsevier.
- Shourgashti, Z., Khorasani, M. T., & Khosroshahi, S. M. E. (2010). Plasma-induced grafting of polydimethylsiloxane onto polyurethane surface: characterization and in vitro assay. *Radiation Physics and Chemistry*, 79(9), 947–952.
- Simón-Allué, R., Pérez-López, P., Sotomayor, S., Peña, E., Pascual, G., Bellón, J. M., & Calvo, B. (2014). Short- and long-term biomechanical and morphological study of new suture types in abdominal wall closure. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 37, 1–11.
- St John, K. R. (2014). The use of compliant layer prosthetic components in orthopedic joint repair and replacement: a review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 102(6), 1332–41.
- Subramaniam, A., & Sethuraman, S. (2014). Biomedical applications of nondegradable polymers. In C. T. L. and M. D. Sangamesh G. Kumbar (Ed.), *Natural and Synthetic Biomedical Polymers* (pp. 301–308). Elsevier, Oxford.
- Thakur, S., & Karak, N. (2013). Castor oil-based hyperbranched polyurethanes as advanced surface coating materials. *Progress in Organic Coatings*, 76(1), 157–164.
- Uscátegui, Y., Arévalo, F., Díaz, L., Cobo, M., & Valero, M. (2016). Microbial degradation, cytotoxicity and antibacterial activity of polyurethanes based on modified castor oil and polycaprolactone. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 27(18), 1860–1879.
- Usman, A., Zia, K. M., Zuber, M., Tabasum, S., Rehman, S., & Zia, F. (2016). Chitin and chitosan based polyurethanes: a review of recent advances and prospective biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 630–645.
- Valério, A., Araújo, P., & Sayer, C. (2013). Preparation of poly (urethane-urea) nanoparticles

- containing açai oil by miniemulsion polymerization. *Polímeros*, 23, 451–455.
- Valero-Valdivieso, M., Ortegon, Y., & Uscategui, Y. (2013). Biopolímeros: avances y perspectivas. *Dyna*, 80(181), 171–180. Retrieved from
- Valero, M. F., & Gonzalez, a. (2012). Polyurethane adhesive system from castor oil modified by a transesterification reaction. *Journal of Elastomers and Plastics*, 44(5), 433–442.
- Vogels, R. R. M., Lambertz, A., Schuster, P., Jockenhoevel, S., Bouvy, N. D., Disselhorst-Klug, C., ... Klink, C. D. (2017). Biocompatibility and biomechanical analysis of elastic TPU threads as new suture material. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 105(1), 99–106.
- Vroman, I., & Tighzert, L. (2009). Biodegradable polymers. *Materials*, 2(2), 307–344.
- Wolf, M. T., Dearth, C. L., Sonnenberg, S. B., Lobo, E. G., & Badylak, S. F. (2015). Naturally derived and synthetic scaffolds for skeletal muscle reconstruction. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 84, 208–221.
- Wu, H., Williams, G. R., Wu, J., Wu, J., Niu, S., Li, H., ... Zhu, L. (2018). Regenerated chitin fibers reinforced with bacterial cellulose nanocrystals as suture biomaterials. *Carbohydrate Polymers*, 180(June 2017), 304–313.
- Zhang, C., Garrison, T. F., Madbouly, S. A., & Kessler, M. R. (2017). Recent advances in vegetable oil-based polymers and their composites. *Progress in Polymer Science*, 71, 91–143.
- Zhou, L., Yu, L., Ding, M., Li, J., Tan, H., Wang, Z., & Fu, Q. (2011). Synthesis and characterization of pH-sensitive biodegradable polyurethane for potential drug delivery applications. *Macromolecules*, 44(4), 857–864.
- Zia, K. M., Barikani, M., Bhatti, I. A., Bhatti, M., & Bhatti, H. N. (2008). Synthesis and characterization of novel, biodegradable, thermally stable chitin-based polyurethane elastomers. *Journal of Applied Polymer Science*, 110, 769–776.
- Zia, K. M., Bhatti, H. N., & Ahmad Bhatti, I. (2007). Methods for polyurethane and polyurethane composites, recycling and recovery: a review. *Reactive & Functional Polymers*, 67(8), 675–692.
- Zieleniewska, M., Auguscik, M., Prociak, A., Rojek, P., & Ryszkowska, J. (2014). Polyurethane-urea substrates from rapeseed oil-based polyol for bone tissue cultures intended for application in tissue engineering. *Poly. Degrad. and Stability*, 108, 241–249.

CAPÍTULO 2

**PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS, MECÁNICAS Y
MORFOLÓGICAS DE LOS MATERIALES PARA SUTURAS EN FUNCIÓN DE
LA ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS MONÓMEROS EMPLEADOS**

2.1 RESUMEN

Los poliuretanos (PUs) representan una clase importante de polímeros termoplásticos y termoestables cuyas propiedades mecánicas, térmicas, y químicas pueden ser modificadas desde la síntesis. El objetivo de esta investigación fue sintetizar materiales no absorbibles en términos de degradación, con propiedades mecánicas aptas para ser utilizados como materiales candidatos para suturas quirúrgicas no absorbibles. Se sintetizaron PUs con polioles derivados del aceite de higuera y diisocianato de isoforona (IPDI), diisocianato de hexametileno (HDI) y 4,4'-metileno-bis(isocianato de ciclohexilo) (HMDI). Se utilizaron como aditivos policaprolactona diol (PCL) y quitosano (Ch). Los materiales fueron evaluados en sus propiedades mecánicas determinando las curvas de tensión-deformación, espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), análisis termogravimétrico (TGA), análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC), ángulo de contacto, absorción de agua, microscopía electrónica de barrido, entre otros. Con base a los resultados se observó que las propiedades mecánicas varían dependiendo del polirol empleado y el tipo de diisocianato, y los aditivos no presentaron efectos significativos sobre las propiedades evaluadas. Los PUs derivados de aceite de higuera con diferente grado de transesterificación (P.2 y P.3) presentaron propiedades mecánicas superiores a los PUs con el polirol sin modificar P.1. Los PUs con diisocianatos alifáticos cíclicos (IPDI y HMDI) presentaron propiedades mecánicas mejores que la obtenidas con materiales sintetizados con el diisocianato alifático lineal (HDI). Los PUs sintetizados con IPDI presentaron los valores más altos de esfuerzo máximo a la ruptura (17 MPa), un módulo de Young entre 0,176 y 0,937 MPa y una elongación superior a 250% cuando se utilizaba el polirol modificado P.3. El tipo de diisocianato, el tipo de polirol y la concentración de PCL presentaron una interacción significativa sobre las propiedades mecánicas y el ángulo de contacto. Los resultados indican que los PUs sintetizados con polioles derivados del aceite de higuera y con el diisocianato IPDI pueden

ser empleados como materiales para el diseño de suturas biomédicas no absorbibles gracias a las propiedades mecánicas, fisicoquímicas y morfológicas presentadas.

2.2 INTRODUCCIÓN

Los poliuretanos (PUs) representan una importante parte de productos industriales que se caracterizan por ser flexibles, resistentes al impacto y durables, características que los convierten en polímeros con múltiples aplicaciones [Špírková 2016]. El proceso de síntesis consiste en la reacción de un poliisocianato con un poliol [Gunatillake 2006, Chashmejahanbin 2014, Vroman 2009]. Los PUs (copolímeros de bloque segmentados) están conformados por segmentos duros (o rígidos) y suaves (o blandos) [Bat 2014, Pergal 2012, Liu 2014]. Los segmentos duros y blandos están conectados por medio de enlaces uretano, donde el segmento duro proporciona los entrecruzamientos físicos dentro de la matriz de segmento blando [Murray 2013].

Actualmente existe un incremento en el uso de materias primas de fuentes renovables, debido principalmente a razones económicas y ambientales. A medida que el precio del petróleo fluctúa, también lo hacen las materias primas poliméricas. De otro lado, debido a la creciente preocupación ambiental, el uso de aceites vegetales como materia prima para la síntesis de polímeros se ha incrementado [Mekewi 2017]. Los aceites vegetales contienen ácidos grasos que varían de una planta a otra y se caracterizan por la presencia de uno, dos o más grados de insaturación, que los hace reactivos y adecuados para una amplia variedad de modificaciones químicas [Mekewi 2017]. El empleo de aceites vegetales en la síntesis de polímeros podría mejorar la biodegradación, la flexibilidad y la compatibilidad [Mekewi 2017].

El aceite de higuera presenta algunas ventajas respecto a los otros aceites para ser empleados como polioles en la síntesis de poliuretanos. Es un aceite que no se emplea en la industria alimenticia [Hejna 2017], ya que contiene compuestos tóxicos como la ricina [Meneguelli de Souza 2018]. Se puede incorporar en la síntesis de PUs sin modificaciones previas, debido al elevado contenido de triglicérido del ácido ricinoléico [Arévalo 2016]. De igual forma contiene insaturaciones que le proporcionan una baja viscosidad permitiendo ser utilizado de forma directa como poliol [Omonov 2017]. Adicional a esto, la presencia de grupos hidroxilos en la estructura química del aceite de higuera facilita modificaciones

químicas del polioliol, con lo que se obtienen diferentes propiedades mecánicas del PU [Uscátegui 2016]. Es el único aceite común que contiene grupos hidroxilo, y adicional a eso la presencia de otros sitios reactivos, dobles enlaces y grupos éster, permite adicionar más grupos hidroxilo reactivos en la cadena y de esta forma se convierte en una materia prima atractiva para la síntesis de PUs [Zhang 2017]. Mediante modificaciones químicas de la estructura es posible variar propiedades como la flexibilidad, el porcentaje de degradación, el carácter hidrofílico, entre otros [Wolf 2015].

Dado que las propiedades mecánicas, térmicas, químicas y biológicas de los PUs se pueden variar durante el proceso de síntesis [Qiu 2013, Shourgashti 2010, Dulińska-Molak 2013, Morral-Ruíz 2014, Chan-Chan 2010], la adición de polímeros, como policaprolactona diol (PCL) o quitosano (Ch) pueden modificar las propiedades de los PUs como la biocompatibilidad [Usman 2016]. La PCL es un polímero atractivo para el desarrollo de biomateriales por presentar propiedades como elevada cristalinidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, facilidad en el procesamiento de biomateriales, entre otras [Wu 2016]. El Ch es un polisacárido que se obtiene de fuentes renovables debido a que hace parte de la estructura de algunos crustáceos. El Ch se caracteriza principalmente por ser biocompatible, biodegradable, bioadhesivo, no tóxico, posee propiedades antimicrobianas, entre otros [Usman 2016, Anirudhan 2016, Kaur 2013]. Estas propiedades le han permitido a la PCL y al Ch ser utilizados en algunas aplicaciones como apósitos para heridas, suturas quirúrgicas, andamios en ingeniería de tejidos, entre otros [Wu 2018].

Son diversas las aplicaciones de PUs en el campo biomédico debido a la variabilidad de propiedades que presentan este tipo de polímeros. Al utilizar cadenas alifáticas provenientes de aceites vegetales, se obtienen PUs flexibles, y al utilizar diisocianatos cíclicos se obtiene mayor resistencia mecánica [Zhang 2017]. Es así como es necesario realizar una caracterización específica de cada uno de los materiales sintetizados para determinar la funcionalidad como materiales candidatos como dispositivos biomédicos. Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue sintetizar materiales tipo PUs con tres polioles derivados del aceite de higuera (*Ricinus communis*) y diisocianato de isoforona (IPDI), diisocianato de hexametileno (HDI) y 4,4'-metileno-bis(isocianato de ciclohexilo) (HMDI), con adición de PCL y Ch, y evaluar las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y morfológicas de los materiales en función de la estructura química de los monómeros empleados para la síntesis.

Al poder relacionar la estructura de los monómeros empleados con las propiedades de los PUs sintetizados, se podría determinar si los PUs pueden ser candidatos en aplicaciones biomédicas como materiales como suturas no-absorbibles.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Reactivos

Aceite de higuera (*Ricinus communis*) adquirido en Químicos Campota y Cía, Ltda., Colombia. diisocianato de isoforona (IPDI), diisocianato de hexametileno (HDI), 4,4'-metilbis(isocianato de ciclohexilo) (HMDI), policaprolactona diol (PCL) con peso molecular promedio de 2000 g mol^{-1} , quitosano (Ch) de bajo peso molecular con un porcentaje de deacetilación entre 75-85% y n-octano fueron adquiridos con Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Pentaeritritol marca Merck & Co., Inc. (Alemania).

2.3.2 Obtención de polioles

Los polioles fueron derivados del aceite de higuera (P.1, P.2 y P.3). P.1 correspondía a aceite de higuera comercial sin modificar. Los polioles P.2 y P.3 se obtuvieron por medio de una transesterificación con pentaeritritol [Valero 2015]. Para la reacción se elevó la temperatura del aceite de higuera a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min. Se incrementó la temperatura a $210 \text{ }^\circ\text{C}$ y se adicionó pentaeritritol (1,32% y 2,64% mol de pentaeritritol/mol de aceite de higuera para P.2 o P.3, respectivamente) y óxido de plomo al 0,05% como catalizador. Se mantuvo a $210 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 h. El índice hidroxilo de los polioles se determinó de acuerdo con la norma ASTM D1957-86 [Valero 2009].

2.3.3 Síntesis de poliuretanos

Para la síntesis de los materiales se utilizó un diseño factorial completo para estudiar el efecto de varios factores sobre las variables de respuesta. Se utilizaron 4 factores, 2 variables categóricas con 3 niveles cada uno, y dos variables numéricas cada uno con 4 niveles igualmente espaciadas, según se observa en la Figura 5. Con este diseño experimental se sintetizaron 144 matrices de PUs en forma de láminas de $15 \text{ cm} \times 9 \text{ cm} \times 0,3 \text{ cm}$ (largo \times ancho \times alto). Los PUs fueron sintetizados por el método del pre-polímero con los diisocianatos IPDI, HDI y HMDI en una relación constante NCO/OH (1:1) [Valero 2014].

El polioliol se llevó a 60 °C y se adicionó el diisocianato y se mantuvo a 300 rpm por 5 min. Se adicionó PCL (0, 5, 10 y 15% p/p con respecto a la masa del polioliol del aceite) y Ch (0, 1, 2 y 3% p/p con respecto a la masa del polioliol del aceite) según se observa en la Figura 5. El curado se realizó a 110 °C durante 12 h [Valero 2015].

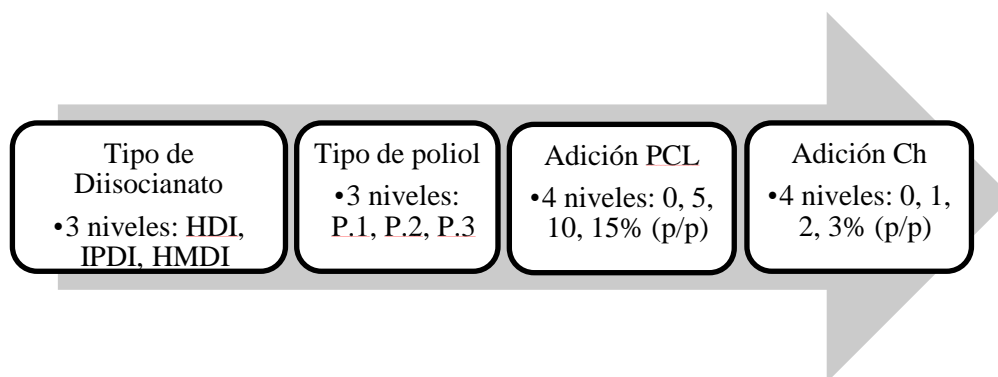


Figura 5. Monómeros y aditivos empleados en el proceso de síntesis de PUs.

Para denotar los polímeros sintetizados, se utilizará la siguiente nomenclatura: P.n-dii-xPCL-yCh, donde n representa el polioliol utilizado (1 para el Aceite de higuierilla sin modificar, 2 para el aceite de higuierilla con 1,32 % de pentaeritritol/mol y 3 para el aceite de higuierilla con 2,64 % pentaeritritol/mol), dii representa el diisocianato utilizado (HDI para el diisocianato de hexametileno, IPDI para el diisocianato de isoforona y HMDI para el 4,4'-metilenbis(isocianato de ciclohexilo)) y x e y representan el porcentaje de PCL y Ch respectivamente. En el Anexo 1 se detallan los códigos de los polímeros sintetizados.

2.3.4 Ensayos mecánicos

Por medio de una máquina de tracción universal EZ-LX (Shimadzu, Japan) se determinó el esfuerzo máximo, el porcentaje de elongación y el módulo de Young de los poliuretanos (siguiendo la norma ASTM D638-10). Se utilizó una celda de carga de 5 kN con una velocidad de desplazamiento de las mordazas de 25 mm min⁻¹ [Simón-Allué 2014, Yoshida 2014]. Tres muestras de 40 mm × 6 mm × 3 mm (largo × ancho × espesor) fueron ensayadas.

2.3.5 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

Las estructuras químicas se evaluaron por medio de un espectrómetro ATR-FTIR (Bruker ALPHA), en un intervalo de 400 y 4000 cm⁻¹. El espectro corresponde al promedio de 24 escaneos a una resolución espectral de 4 cm⁻¹ [Mekewi 2017, Shah 2018].

2.3.6 Análisis térmico

Análisis termogravimétrico. El comportamiento térmico fue evaluado en un analizador termogravimétrico acoplado a calorimetría diferencial de barrido modelo TGA/DCS1 (Mettler Toledo, USA). De acuerdo con la norma ASTM D6370 las condiciones usadas fueron: velocidad de calentamiento de 25 °C min⁻¹, rango de temperatura de 25-600 °C, atmósfera de nitrógeno y muestras de 15±2 mg [Arévalo 2016].

Calorimetría diferencial de barrido. Se determinó la temperatura de transición vítrea por medio de un analizador DSC (calorimetría diferencial de barrido), modelo DSC 3+ (Mettler Toledo, USA). Las condiciones fueron las siguientes: rango de temperatura desde -70 °C hasta 150 °C, atmósfera de nitrógeno con 20 mL min⁻¹ de flujo y con muestras de peso 10±2 mg [Hormaiztegui 2018].

2.3.7 Carácter hidrofílico

Ángulo de contacto. Se determinó con un equipo para medir ángulo de contacto “Drop Shape Analysis – DSA” (GH11, Krüss) (Alemania). De acuerdo con la norma ASTM-D7334-08 (2013) la medición se realizó con el método de perfil de gota sésil “sessile drop”, utilizando 10 µL de agua destilada a 20 °C [Kanmani 2014]. Se realizaron 10 mediciones de cada material.

Porcentaje de absorción de agua. Para remover cadenas no entrecruzadas y residuos de monómeros tras la síntesis, los materiales de PU se lavaron con etanol durante dos días, renovando el etanol cada día. Después el solvente se reemplazó por agua desionizada durante dos días más. Los materiales se secaron en cámara de vacío (0,01 mm Hg) a 37 °C durante 24 h [Conejero-García 2017]. El porcentaje de absorción de agua se determinó por inmersión en agua destilada de la muestra hasta obtener peso constante. Luego se retiró el agua residual de las muestras con papel filtro seco y se pesaron las muestras [Członka 2018]. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. El porcentaje de absorción de agua a equilibrio fue calculado comparando la masa de la muestra (m_t) después de obtener peso constante, con la masa inicial (m_i) de la muestra usando la ecuación 1 (Ec. 1):

$$\% \text{ de absorción de PUs} = \frac{m_i - m_t}{m_i} * 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

2.3.8 Determinación de densidad

La densidad de los materiales se determinó utilizando la técnica del empuje de Arquímedes con una balanza Mettler AX 205 (Mettler-Toledo Inc.) con una sensibilidad de 0.01 mg y con un kit para determinar densidad Mettler ME 33360. Se utilizaron muestras secas de 5 mm × 5 mm × 3 mm para calcular la densidad por triplicado. Los PUs se pesaron en el aire (m_{aire}) y luego se sumergieron en n-octano con una densidad conocida ($\rho_{n-octano}$) y se obtuvo el peso en inmersión ($m_{n-octano}$) a 20 °C. La densidad se calculó por medio de la siguiente ecuación 2 (Ec. 2) [Conejero-García 2017]:

$$Densidad\ de\ PUs = \frac{m_{aire}\rho_{n-octano}}{(m_{aire}-m_{n-octano})} \quad (Ec.\ 2)$$

2.3.9 Análisis térmico dinamo-mecánico (DMTA)

El efecto de la temperatura sobre las propiedades mecánicas se evaluó por medio de un ensayo de DMTA. Se utilizó un analizador termomecánico DMA 8000 PerkinElmer a una frecuencia de 1 Hz, una deformación del 0,1% y un programa de temperatura entre -90 °C y 150 °C, con una velocidad de calentamiento de 5 °C min⁻¹. Se determinó el módulo de almacenamiento y el factor de pérdidas, tan δ [Gurunathan 2015].

2.3.10 Microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM)

La caracterización morfológica de los PUs se realizó en un Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (FESEM), ZEISS (ULTRA 55) de Oxford Instruments. Los PUs se lavaron con etanol durante dos días, renovando el etanol cada día. Después el solvente se reemplazó por agua desionizada durante dos días más. Los materiales se secaron en cámara de vacío (0,01 mm Hg) a 37 °C durante 24 h [Conejero-García 2017]. Las muestras se recubrieron con platino para observar la morfología de los materiales, con un voltaje de aceleración de 5 kV [Basak 2012].

2.3.11 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como valores promedios \pm desviación estándar (SD). Los datos fueron analizados por medio de un análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias significativas fueron determinadas para $p < 0,05$. Para la comparación entre muestras se utilizó la prueba t-Student con el Software SPSS Statistics 23. Se realizó una evaluación de superficie de respuesta por medio del programa estadístico Design-Expert®.

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Propiedades mecánicas de PUs

Para cada uno de los polioles derivados del aceite de higuera se determinó el índice hidroxilo luego del proceso de modificación química. Para el polirol sin modificar (P.1) se obtuvo un índice de 160 mg KOH g⁻¹ de aceite de higuera. En el caso de los polioles modificados los valores fueron 191 y 236 mg KOH g⁻¹ para P.2 y P.3, respectivamente.

Los diisocianatos más empleados en la síntesis de PUs son los aromáticos gracias a las propiedades mecánicas que generan, pero pueden producir diaminas carcinogénicas y mutagénicas luego de un proceso de degradación [Laube 2017], razón por la cual para esta investigación se emplearon diisocianatos alifáticos para evitar efectos secundarios de los materiales sobre los tejidos vivos. Un ensayo mecánico es fundamental para establecer la aplicación de determinado biomaterial, ya que permite obtener los parámetros de carga que son requeridos para un tejido de interés [Temenoff 2008]. Es así como se evaluaron las propiedades mecánicas de las 144 matrices de PUs por medio de la determinación de las curvas de tensión – deformación con las que se calculó el esfuerzo máximo, el porcentaje de elongación y el módulo de Young. En el Anexo 2 se presentan los resultados de esfuerzo máximo y el porcentaje de elongación de las matrices sintetizadas con HDI, IPDI y HMDI, respectivamente. En la Figura 6 se presentan los resultados del esfuerzo máximo y el porcentaje de elongación según el tipo de polirol y el diisocianato empleado en la síntesis.

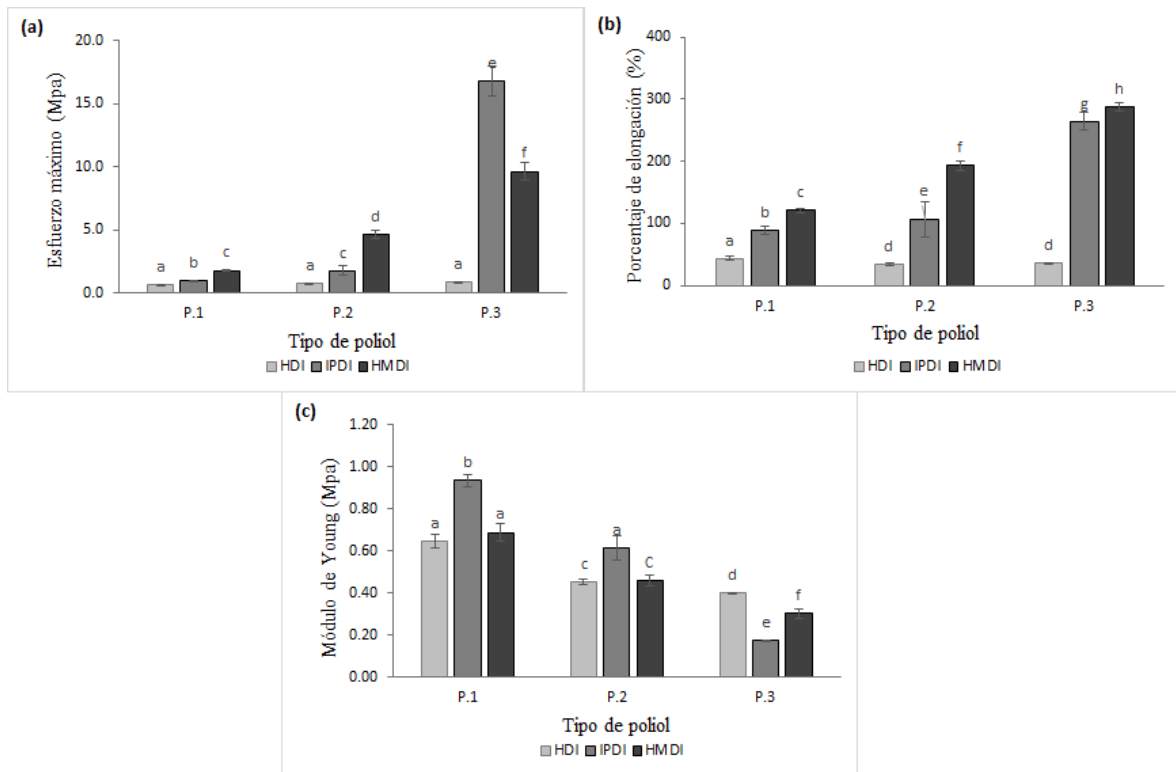


Figura 6. Propiedades mecánicas de PUs sintetizados según el tipo de polirol y diisocianato. (a) Esfuerzo máximo de PUs. (b) Porcentaje de elongación de PUs. (c) Módulo de Young de PUs. Los datos están presentados como la media \pm SD (n=3). Barras con letras diferentes (a, b, c, d, e, f, g, h) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al tipo de polirol.

Según se ha mencionado en párrafos anteriores, las propiedades físicas y mecánicas dependen de la estructura atómica y molecular de los materiales empleados en la síntesis. La naturaleza de los enlaces y las sub-unidades de la estructura afectan las propiedades mecánicas y por lo tanto propiedades de tensión/deformación, las cuales son de interés para la evaluación de biomateriales [Temenoff 2008]. Es así como en la Figura 6 se observa que la estructura del diisocianato utilizado influye en las propiedades mecánicas presentando diferencias estadísticas ($p < 0,05$), por lo que una estructura lineal como la del HDI genera PUs con menores propiedades mecánicas (esfuerzo máximo y porcentaje de elongación) comparado con las estructuras que contienen anillos como la del IPDI y el HMDI. El mayor valor de esfuerzo máximo (16,86 MPa) se obtuvo con el IPDI y el polirol P.3. Como se observa en la Figura 3 (Capítulo I) el HDI consiste en una cadena lineal entre los dos grupos isocianato, el IPDI y el HMDI son diisocianatos alifáticos que contienen uno y dos anillos respectivamente, entre los dos grupos isocianato. Esto se debe a que algunos de los factores que definen el comportamiento reológico de los materiales resultantes dependen de la

estructura química de los diisocianatos empleados, entre los que se puede mencionar la isomería conformacional, los enlaces, el tamaño molecular, entre otros [Borrero-López 2017]. Es por esto que se puede inferir que el tamaño de la molécula y el impedimento estérico que presentan los diisocianatos alifáticos cíclicos, favorece la densidad de entrecruzamiento [Borrero-López 2017].

En cuanto al tipo de polioliol (derivados del aceite de higuera: P.1, P.2 y P.3) se observa en la Figura 6(a) un incremento en el esfuerzo máximo de todos los materiales sintetizados con el polioliol P.3 con los diisocianatos IPDI y HMDI, es decir, con el polioliol que presenta mayor grado de entrecruzamiento. Es así como la modificación química realizada a los polioliolos incrementa la tensión máxima debido al incremento de los entrecruzamientos físicos de las matrices poliméricas [Vannozzi 2017a].

Las propiedades mecánicas de los PUs son atribuidas a los dominios de segmentos blandos y duros, respectivamente [Chashmejahanbin 2014]. Dependiendo de la estructura de los segmentos duros y blandos, los dominios cristalinos y amorfos se pueden formar y eso define la rigidez y estabilidad del material [Braun 2016]. Los puentes de hidrógeno causan fuertes interacciones y por lo tanto, la naturaleza polar del segmento duro causa una fuerte atracción generando una formación de los dominios [Jutrzenka Trzebiatowska 2018]. Es por esto que al utilizar el polioliol P.3 y el IPDI en la síntesis, se incrementan los valores de las propiedades mecánicas ya que los segmentos blandos presentan mayor cantidad de grupos hidroxilo, lo que a su vez incrementa la densidad de entrecruzamiento, y los segmentos duros están conformados por un anillo que generará mayor resistencia.

Con respecto al porcentaje de elongación a la ruptura (Figura 6(b)), el análisis presentó diferencias estadísticas ($p < 0,05$) del polioliol P.1 comparado con los otros polioliolos (P.2 y P.3), presentando un incremento del porcentaje a medida que se modificaba el polioliol. También se observa un efecto por el tipo de diisocianato, ya que los valores más altos se lograron con los diisocianatos alifáticos cíclicos. Las propiedades mecánicas de los PUs dependen de muchos factores, entre los que se puede mencionar el peso molecular, los enlaces químicos, el entrelazamiento, la cristalinidad del polímero y el tamaño, la forma y la interacción del segmento duro presente en la estructura [Thakur 2013]. Es por esto que los PUs con un mayor grado de entrecruzamiento presentan valores de esfuerzo máximo y porcentaje de elongación mayor independientemente del tipo de diisocianato empleado. Un mayor grado de

entrecruzamiento genera una estructura más compacta [Thakur 2013]. Un incremento en la resistencia se atribuye al contenido de puentes de hidrógeno intermolecular y la densidad de entrecruzamiento [Gurunathan 2015].

Al analizar el comportamiento de los aditivos empleados en la síntesis sobre las propiedades mecánicas (Anexo 2), se puede observar que para el diisocianato HDI no se afecta el esfuerzo máximo con la adición de PCL y Ch. Los materiales que presentan diferencias corresponden a los que tienen 2 y 3% de Ch, generando una disminución del esfuerzo máximo. En el caso del diisocianato IPDI se encuentran diferencias estadísticas cuando se adiciona 3% de Ch con el polioliol P.2, siendo un valor superior a todos los materiales sintetizados con P.1 y P.3. Para el polioliol P.3 se observa que los aditivos disminuyen el esfuerzo máximo comparado con el control. Por último, para el diisocianato HMDI se observa que para P.2 y P.3 se disminuye el esfuerzo máximo al adicionar PCL y Ch con respecto a control.

En una investigación desarrollada por Chen *et al.* (2018) sintetizaron PUs con PCL como polioliol, IPDI y PLA y obtuvieron valores de resistencia a la tracción entre 41 y 60 MPa cuando se utilizan relaciones de ácido poliláctico (PLA) y PUs a base de PCL en un rango de 80/20 y 95/5. Los autores atribuyen la disminución de la resistencia a medida que incrementa la relación de PCL al efecto plastificante de ciertos polioliol de PCL no reticulados, y a una posible disminución de la compatibilidad a medida que incrementa el contenido de PCL [Chen 2018].

Un efecto similar se observa para el porcentaje de elongación, ya que para el IPDI y HMDI se disminuye el porcentaje de elongación cuando se adiciona PCL y Ch con el polioliol P.3. El resto de materiales no presentan diferencias con los aditivos empleados respecto al control. La flexibilidad que presentan los PUs puede ser debida a la larga cadena de hidrocarburos del aceite presentes en la cadena del polímero [Thakur 2013].

Dado que el módulo de elasticidad presenta una noción de la rigidez del material, se espera que a mayor rigidez, el módulo de elasticidad también sea mayor. En la Figura 6(c) se observa que los materiales que presentan un elevado porcentaje de elongación, son los que presentan el valor más bajo del módulo. Esto coincide con los resultados evaluados por Park *et al.* (2013), quienes sintetizaron PUs con policaprolactona, diisocianato de hexametileno e isosorbida con adiciones de seda, y determinaron que el porcentaje de seda más alto

incrementaba el resultado de rigidez y disminuía el esfuerzo máximo. Los autores afirmaron que el diseño de polímeros flexibles y suaves permite generar una amplia gama de biomateriales para regeneración de tejidos blandos como músculo y ligamento [Park 2013]. De igual forma, Vannozzi *et al.* (2017) mencionaron que en general los sustratos suaves y deformables representan características claves para la ingeniería de tejidos del músculo esquelético [Vannozzi 2017].

Para diseñar estructuras a escalas micro que mimeticen tejidos vivos, es necesario que los valores del módulo elástico superen los 10 kPa [Rezvanain 2017]. Con los resultados encontrados, se puede sugerir a los PUs sintetizados como candidatos a materiales de suturas debido a que los rangos de valores del módulo elástico son superiores a 200 kPa. Esto teniendo en cuenta que el módulo elástico de los tejidos de piel humano se encuentra en un rango entre 50 kPa y 100 MPa [Wu 2016, Garg 2012].

Es indispensable que el diseño de un biomaterial combine flexibilidad con resistencia para de esa forma lograr propiedades mecánicas similares a las de la piel nativa [Kim 2012]. Vannozzi *et al.* (2017) diseñaron *scaffolds* porosos de PU en 3D y determinaron que el valor del módulo de Young de los materiales sintetizados fue superior a 250 kPa y por lo tanto proponen que estos materiales poseen potencial en el campo de la ingeniería de tejidos [Vannozzi 2017]. Por lo anterior, y luego de analizar las propiedades mecánicas, se puede proponer a los PUs sintetizados con IPDI como aptos para ser utilizados como materiales candidatos como suturas biomédicas, ya que presentan el esfuerzo máximo más alto y un porcentaje de elongación elevado, bajo las condiciones de estudio.

Dado que el diseño experimental consistió en un factorial completo con dos variables categóricas y dos variables numéricas, se realizó un análisis de superficie de respuesta con el programa estadístico Design-Expert® para ratificar el análisis presentado en los párrafos anteriores. En la Figura 7 se presentan los resultados del análisis estadístico de los resultados del esfuerzo máximo de las 144 matrices.

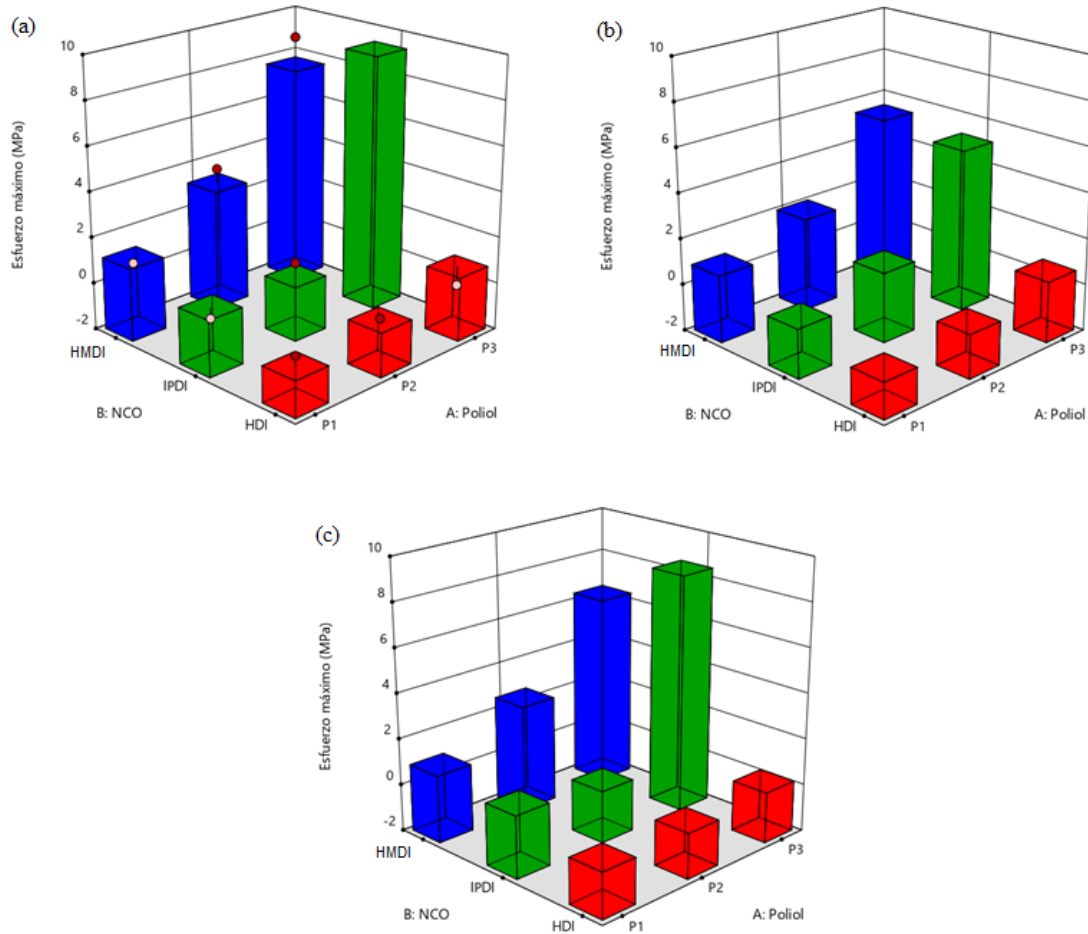


Figura 7. Superficies de respuesta de Esfuerzo máximo de todas las matrices sintetizadas (144 PUs). (a) Relación entre tipo de diisocianato y polioli sin aditivos; (b) Relación entre tipo de diisocianato y polioli con PCL; (c) Relación entre tipo de diisocianato y polioli con Ch. Los datos están presentados como la media \pm SD (n=3).

De acuerdo con el análisis estadístico se determinó un efecto significativo ($p < 0,0001$) entre tres de las variables evaluadas: el diisocianato (NCO), el tipo de polioli y el contenido de PCL. En la Figura 7(a) se presenta el análisis de la relación entre el tipo de diisocianato y el polioli con un 0% de aditivos. Se pudo observar que el tipo de diisocianato y el tipo de polioli presentaron una fuerte influencia sobre la propiedad mecánica evaluada. Es así como el diisocianato de IPDI y el polioli P.3 presentan valores superiores a las otras matrices sintetizadas. Al realizar el análisis sobre el efecto de la adición de la PCL, se observa que el esfuerzo máximo tiende a disminuir (Figura 7(b)), caso contrario a lo que se observó con la adición del Ch (Figura 7(c)) ya que esta variable no presenta un efecto significativo sobre los resultados.

El mismo análisis se realizó para el porcentaje de elongación (Figura 8) y se encontró un efecto significativo ($p < 0,0001$) entre el tipo de diisocianato, tipo de polioliol y concentración de PCL. Igual que en el caso anterior, la concentración de PCL tiende a disminuir el porcentaje de elongación, y la concentración de Ch no presentó efecto significativo sobre la propiedad evaluada. El porcentaje de elongación presenta valores superiores cuando se utilizaron los diisocianatos IPDI y HMDI y el polioliol P.3, según se observa en la Figura 8.

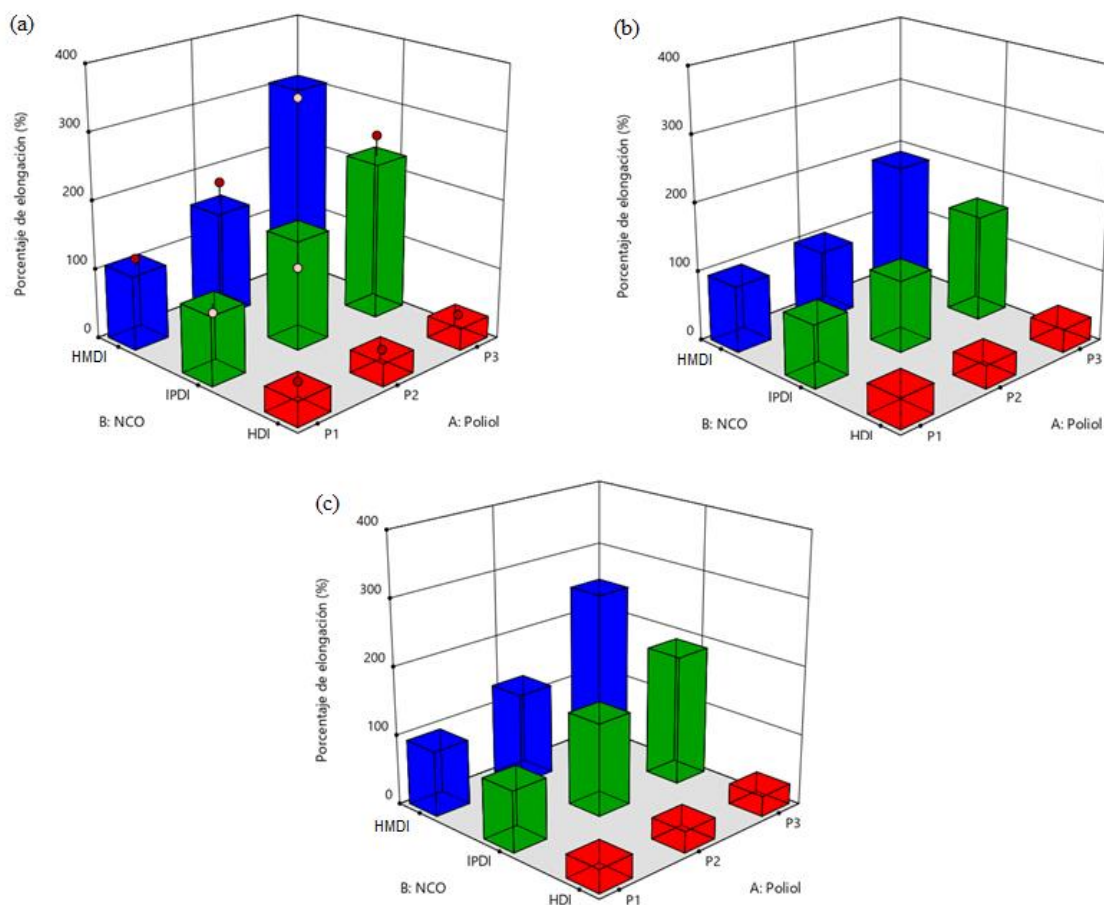


Figura 8. Superficies de repuesta del porcentaje de elongación de todas las matrices sintetizadas (144 PUs). (a) Relación entre tipo de diisocianato y polioliol sin aditivos; (b) Relación entre tipo de diisocianato y polioliol con PCL; (c) Relación entre tipo de diisocianato y polioliol con Ch. Los datos están presentados como la media \pm SD (n=3).

2.4.2 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

Con un análisis FTIR se determinó la eficiencia del proceso de síntesis por medio de la identificación de grupos funcionales característicos de los PUs y la ausencia de picos característicos de los monómeros empleados en el proceso de síntesis. Los espectros de infrarrojo de los PUs sintetizados según el tipo de polioliol y el diisocianato se observan en la Figura 9.

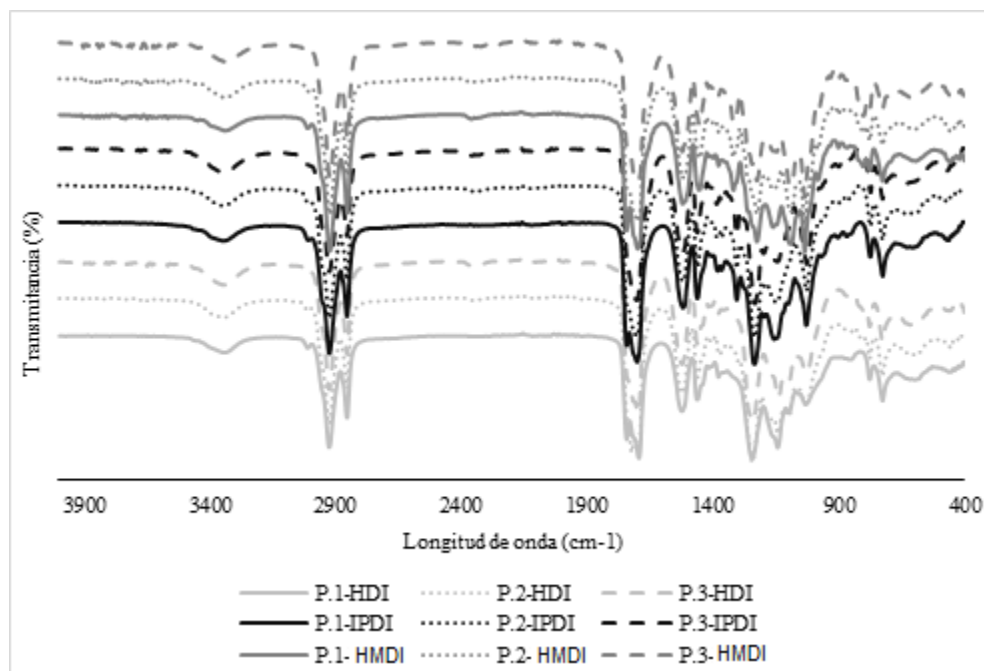


Figura 9. Espectros de FTIR de PUs sintetizados según el tipo de polioliol y diisocianato.

En la Figura 9 se observa que todos los espectros FTIR presentan picos similares independiente del polioliol o del diisocianato empleado en la síntesis, y los picos observados corresponden a matrices de PU esperadas. La ausencia del pico de tensión del enlace $-N=C=O$ de los diisocianatos a 2250 cm^{-1} [Laube 2017], indica que no se encuentran grupos isocianato libres sin reaccionar en las matrices de PU sintetizadas, con lo que se puede inferir que la reacción fue completa.

En los espectros se pueden observar picos característicos de PUs. Es así como alrededor de los 3330 cm^{-1} se observan las bandas características a vibraciones de estiramiento de los enlaces $-N-H$ [Shah 2018] con lo que se puede inferir que corresponden a los enlaces uretano generados en las matrices. Cercano a los 2923 cm^{-1} se muestra el pico de estiramiento del grupo metil, mientras que alrededor de los 2855 cm^{-1} se presentan el estiramiento simétrico

del enlace C-H. Cerca de los 1700 cm^{-1} se presenta una banda intensa debida al estiramiento del enlace C=O [Shah 2018] indicando así la formación del grupo uretano. Alrededor de los 1250 cm^{-1} se observa el estiramiento del enlace C-N; cerca de los 1140 cm^{-1} se presentan las vibraciones de estiramiento del enlace C-O [Thakur 2013].

En el Anexo 3 se presentan los espectros FTIR de 16 matrices sintetizadas con el polioli P.1 y el diisocianato IPDI con adición de PCL y Ch. Los resultados son comparables con los obtenidos para los polioles P.2 y P.3 con el mismo diisocianato. De igual forma se observó el mismo comportamiento para las matrices sintetizadas con los diisocianatos HDI y HMDI (estos resultados no se muestran).

2.4.3 Análisis térmico

Análisis termogravimétrico. El análisis termogravimétrico se realizó por medio de termogramas de los PUs. En la Figura 10 se presentan los resultados para las matrices sintetizadas según el tipo de polioli y el diisocianato.

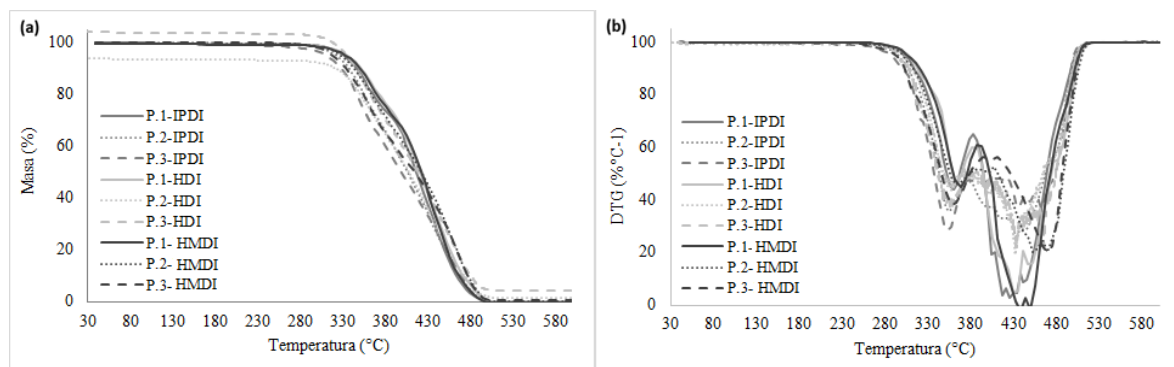


Figura 10. Termogramas de los Poliuretanos sintetizados según el tipo de polioli y diisocianato. (a) Curva TG de los PUs. (b) Curva DTG de los PUs.

Según se presenta en la Figura 10 para los PUs sintetizados con los tres polioles y los tres diisocianatos, se conserva una tendencia con respecto al comportamiento térmico, lo que indica que no se presentan desplazamientos de las temperaturas de degradación con el uso de polioles modificados ni con la variación del diisocianato. Al obtener las curvas derivadas del análisis termogravimétrico se observó la presencia de varios picos, lo que concuerda con otros autores que afirman que el mecanismo de degradación de los PUs es complejo por la formación de diversos compuestos en el proceso [Cakić 2017].

Para cada una de las matrices poliméricas se obtuvo un termograma, con el cual se determinó la estabilidad de los PUs sintetizados en este estudio (los resultados completos no se muestran). Se observó que el tipo de polioliol, diisocianato y aditivos no afectan la estabilidad térmica de los materiales al compararlo con el material sintetizado con polioliol y diisocianato sin aditivos. En los termogramas se observó que todos los PUs son estables a temperaturas inferiores a 300 °C y presentan una degradación completa a temperaturas cercanas a los 600 °C, lo que coincide con la investigación desarrollada por Jutrzenka *et al.* (2018), quienes sintetizaron PUs a base de un derivado de glicerina, polietileno-butileno y diisocianato de difenilmetano, y determinaron que los materiales eran estables hasta los 300 °C [Jutrzenka Trzebiatowska 2018]. En un estudio sobre PUs sintetizados con aceite de higuera y diisocianato de isoforona que fueron propuestos como adhesivos quirúrgicos, presentan los mismos valores de degradación y los autores afirmaron que los valores relacionados con las temperaturas de degradación no afectan la aplicación biomédica, ya que la temperatura fisiológica es inferior (≈ 37 °C) [Ferreira 2007].

En general, para las matrices poliméricas se detectaron tres regiones de degradación. Eso concuerda con el estudio realizado con matrices poliméricas sintetizadas con aceite de higuera, diisocianato de isoforona, con adición de PCL y Ch en diferentes concentraciones [Arévalo 2016]. La primera etapa de degradación se observa en un rango de 250-370 °C y corresponde a la degradación térmica de los enlaces de uretano que se forman en los segmentos duros y se caracterizan por ser térmicamente inestables [Bakhshi 2014]. La segunda etapa se encuentra entre 375-430 °C y corresponde a la degradación de los segmentos suaves [Jutrzenka Trzebiatowska 2018]. Esto coincide con lo observado por Aung *et al.*, (2014) quienes sintetizaron adhesivos de PU basados en aceite de *Jatropha* y determinaron que los segmentos duros se descomponen antes que los segmentos blandos (cerca de 400 °C) [Aung 2014]. La última etapa se encuentra en un rango de 425-500 °C y corresponde a la degradación térmica de los enlaces dobles de ácidos grasos remanentes del aceite de ricino [Corcuera 2010].

Calorimetría diferencial de barrido (DSC). En la Figura 11 se encuentran las curvas de DSC para las matrices sintetizadas con el polioliol P.1 y con los tres diisocianatos. Con la evaluación de las curvas DSC se determinó la temperatura de transición vítrea (T_g) de los PUs. En el Anexo 4 se presentan los valores de la T_g para todos los materiales sintetizados

con IPDI. Se seleccionaron los PUs sintetizados con IPDI debido a los resultados obtenidos con el análisis estadístico de las propiedades mecánicas.

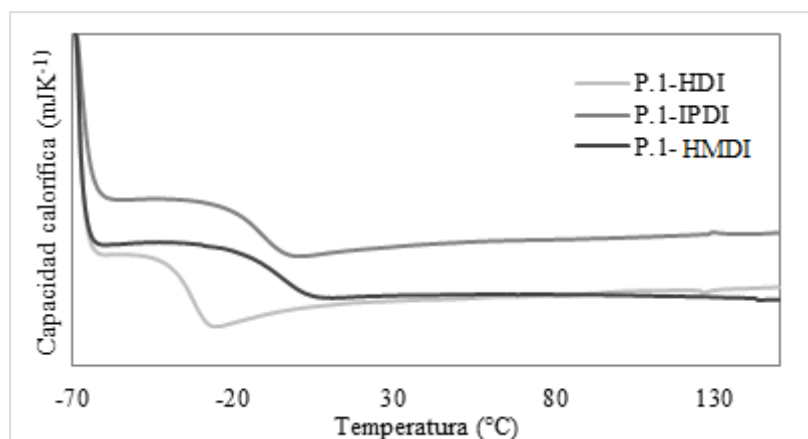


Figura 11. Termogramas DSC de PUs sintetizados con el polirol P.1 y con diferente diisocianato.

En la Figura 11 se observa que el tipo de diisocianato influye significativamente sobre la T_g . Esto coincide con lo explicado en las propiedades mecánicas sobre la estructura molecular del diisocianato. Los valores de la T_g para HDI, IPDI y HMDI sin aditivos son $-35,82\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-14,79\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-8,57\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Es así como el diisocianato alifático lineal (HDI) presenta los valores más bajos de T_g (entre $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aproximadamente). Los diisocianatos alifáticos con anillos como el IPDI y el HMDI presentan valores superiores de T_g , posiblemente debido a la energía necesaria para reorganizar las moléculas del PU.

De igual forma, se observa que el tipo de polirol también presenta un efecto sobre la T_g , es así como la tendencia observada consiste en disminuir la T_g a medida que se disminuye el índice hidroxilo, lo que coincide con el tipo de entrecruzamiento de los PUs sintetizados, indicando que se necesita una energía mayor para reordenar la estructura por un cambio entre las fuerzas intermoleculares. Esto puede ser debido a interacciones secundarias resultantes de la estructura hiperramificada generada [Saikia 2017]. Las propiedades térmicas de los PUs dependen de la cantidad de enlaces uretano presentes en la estructura, ya que éstos pueden tolerar una cantidad considerable de calor [Thakur 2017]. Saénz-Pérez *et al.* (2016) sintetizaron PUs con glicol de polioxotetrametileno y diisocianatos de difenilmetano o tolueno y butanodiol. En la determinación de la T_g encontraron que los valores incrementaban a medida que se aumentaba la cantidad del extensor de cadena. Por lo tanto, los autores

afirman que el incremento del valor de la T_g fue generado por la reducción en la movilidad de los segmentos de la cadena, debido al incremento de los segmentos duros [Sáenz-Pérez 2016].

El triglicérido del ácido ricinoléico del aceite de higuera empleado como polioliol contiene una estructura ordenada donde los grupos hidroxilo tienen una distribución uniforme dentro de la cadena, lo que permite obtener un PU con una estructura uniformemente reticulada con lo que se logran propiedades mecánicas elevadas y estabilidad térmica [Zhang 2017]. De forma general se puede decir que todas las matrices sintetizadas presentan un solo valor de T_g lo que indica que todos los materiales presentan una dispersión homogénea de los segmentos. Los resultados de la T_g son similares a los reportados para PUs a base de polietilenglicol, poli (ϵ -caprolactona-co-D, L-lactida) y diisocianato de diuretano (con diisocianato de hexametileno y butanodiol), donde los autores encontraron valores cercanos a -33 °C. Del mismo modo, los autores no encontraron picos exotérmicos porque los materiales eran amorfos [Hou 2016]. Con lo expuesto en los párrafos anteriores, se puede generalizar que los PUs son estables térmicamente y que pueden ser empleados en diversas aplicaciones biomédicas como por ejemplo como materiales para suturas no absorbibles.

2.4.4 Carácter hidrofílico

Ángulo de contacto. Para evaluar el carácter hidrofílico de los PUs se determinó el ángulo de contacto del agua sobre sus superficies. En la Figura 12 se presentan los resultados de los PUs sintetizados según el tipo de polioliol y diisocianato empleado.

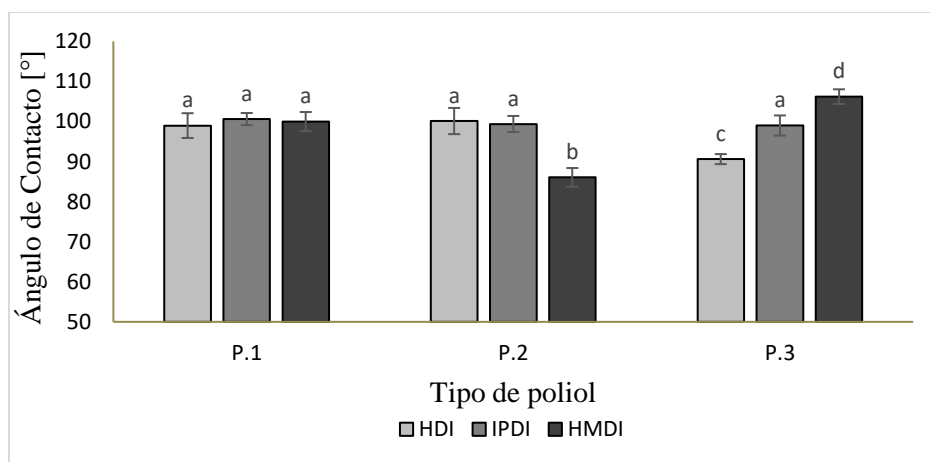


Figura 12. Ángulo de contacto de PUs sintetizados según el tipo de polioliol y diisocianato. Los datos están presentados como la media \pm SD (n=10). Las barras con letras diferentes (a, b, c, d) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

De acuerdo con el análisis estadístico de la Figura 12, se observa que para el polioli P.1 no se presentan diferencias significativas con los diisocianatos empleados. Caso similar sucede con P.2 para los diisocianatos HDI e IPDI, puesto que para HMDI se presenta una disminución del ángulo. Para P.3 se observan diferencias estadísticas con los tres diisocianatos debido a que se presenta una reducción de los valores del ángulo con el diisocianato lineal, indicando una disminución del carácter hidrofóbico. Esto probablemente sea debido a la rigidez del material, lo que a su vez incrementa la afinidad por el agua.

En el Anexo 5 se presentan los resultados del ángulo de contacto de todas las matrices sintetizadas con IPDI, que fue seleccionado de acuerdo con el análisis estadístico previo de las propiedades mecánicas. Según el análisis estadístico se puede inferir que la adición de PCL y de Ch sobre los valores del ángulo de contacto, no presenta diferencias significativas ($p < 0,05$) y por lo tanto no influyen sobre el carácter hidrofílico. Se encontraron valores cercanos a 100 grados, por lo que se puede deducir que los materiales tienden a ser de carácter hidrofóbico. Mi *et al.* (2017) determinaron el ángulo de contacto de PUs termoplásticos a base de PCL y diferentes extensores de cadena y los valores fueron cercanos a 90 grados. Atribuyen los resultados del ángulo de contacto a los grupos funcionales hidrofílicos que están en los extensores de cadena empleados. Los autores afirman que aunque los PUs mantienen la misma estructura química, la variación de los monómeros en la síntesis puede afectar la humectabilidad y por lo tanto variar el comportamiento de degradación [Mi 2017].

De igual, forma Gossart *et al.* (2018) evaluaron el ángulo de contacto de PUs sintetizados con diisocianato de L-lisina, metacrilato de hidroxietilo y poli(hexametileno-carbamato) y encontraron valores superiores a 80 grados. Los autores afirman que los valores comunes reportados para matrices de PUs se encuentran en un rango de 80 a 90 grados y que depende de la estructura del PU y de las interacciones con las superficies [Gossart 2018]. Los resultados del ángulo de contacto de la Figura 12 son superiores a los reportados; posiblemente sea por la red entrecruzada que genera por el tipo de monómeros empleados en la síntesis y que hacen que los materiales tiendan a ser hidrofóbicos.

Se realizó un análisis de superficie por medio de Design-Expert® de la interacción que tiene el tipo de diisocianato, el tipo de polioli y las diferentes concentraciones de PCL y Ch sobre el ángulo de contacto (Figura 13). Se encontró un efecto significativo ($p < 0,0001$) entre el tipo de diisocianato, el tipo de polioli y la concentración de PCL. La concentración de Ch

no presenta efectos significativos sobre los valores del ángulo de contacto de acuerdo con el análisis.

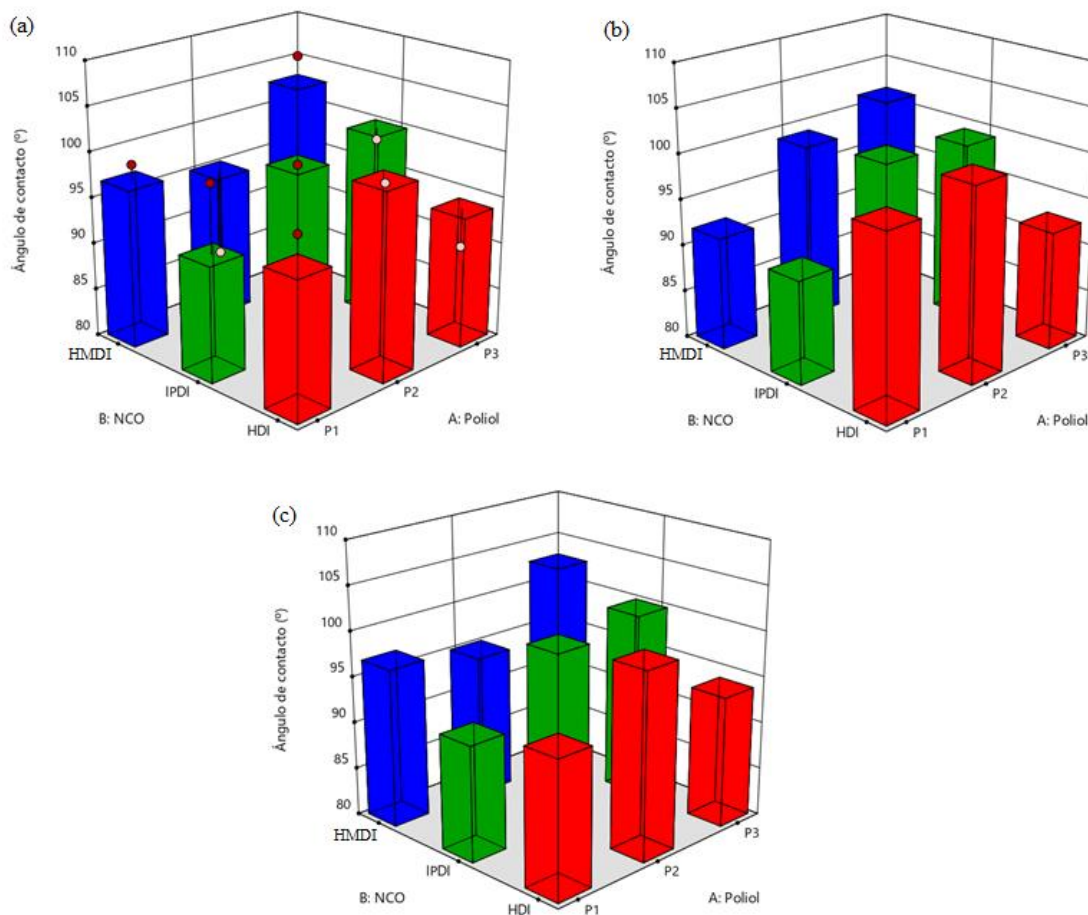


Figura 13. Superficies de repuesta del porcentaje de elongación de todas las matrices sintetizadas (144 PUs). (a) Relación entre tipo de diisocianato y polirol sin aditivos; (b) Relación entre tipo de diisocianato y polirol con PCL; (c) Relación entre tipo de diisocianato y polirol con Ch. Los datos están presentados como la media \pm SD (n=3).

El IPDI es uno de los diisocianatos que tiene un comportamiento similar de ángulo de contacto con los tres tipos de poliroles, es decir no presenta diferencias significativas y por lo tanto no varía el carácter hidrofílico. De acuerdo con los resultados observados sobre las propiedades mecánicas, térmicas, de infrarrojo y el carácter hidrofílico que ejerce el efecto del diisocianato sobre dichas propiedades, se decidió continuar la investigación con el IPDI debido a que representaba mejor las propiedades requeridas para proponer al material como candidato en el diseño de suturas biomédicas no absorbibles.

Porcentaje de absorción de agua. En la Figura 14 se presentan los resultados del porcentaje de absorción de agua de los PUs sintetizados con IPDI y la adición de PCL y Ch durante 72 h de ensayo.

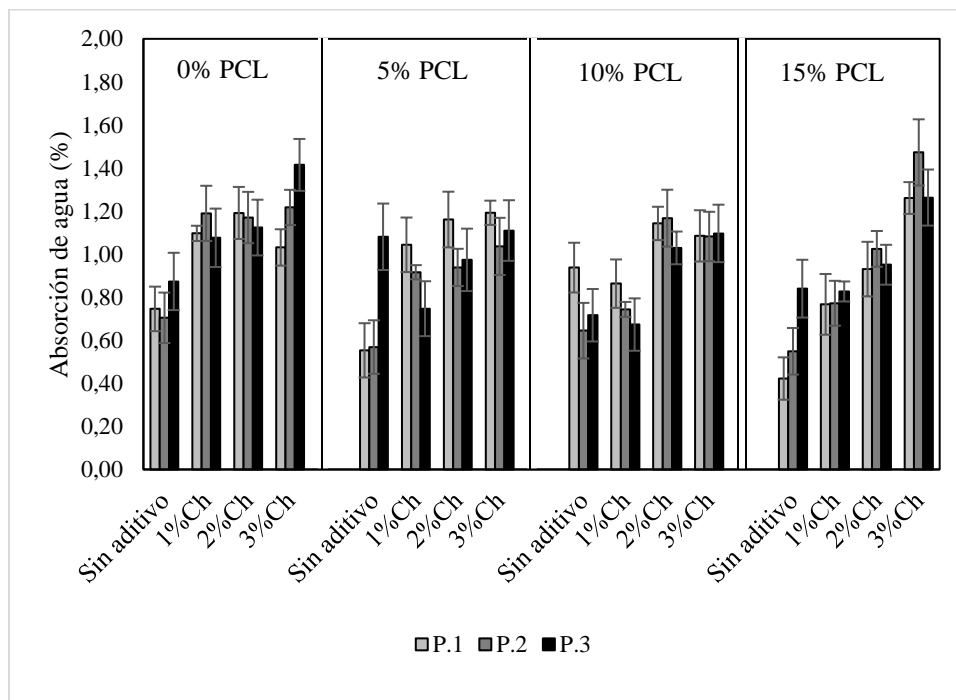


Figura 14. Porcentaje de absorción de agua durante 72 h. Los resultados de absorción están dados como la media \pm SD (n=3).

Se realizó un seguimiento de los pesos de los materiales hasta obtener peso constante durante 24, 48, 72 y 144 h, pero los datos no se muestran por no presentar diferencias estadísticas luego de las 48 h. Según los resultados, se puede observar que los valores del porcentaje de absorción de agua oscilan entre 0,5 y 1,5%. Según se observa en la Figura 14, la adición de PCL y Ch tienden a aumentar el porcentaje de absorción comparado con el material que no contiene aditivos, aunque la diferencia en los porcentajes no es superior a la unidad. Es probable que, al aumentar la cantidad del aditivo, se presenten más grupos funcionales disponibles para interactuar con el medio, que también es polar. Sin embargo, al aumentar la funcionalidad del polioliol, el efecto generado es inverso, como se observó para los materiales sintetizados con P.3 y 5% de PCL que presentaron una reducción del porcentaje de absorción con respecto al PU sin aditivo. Las interacciones internas (puentes de hidrógeno) aumentan el efecto barrera al evitar la difusión del fluido. Además, la función de aditivo hace que las cadenas se reorganicen, presentando una reducción de los defectos volumétricos o las vacantes en las que se puede depositar el agua [Temenoff 2008].

Marques *et al.* (2016) evaluaron un bioadhesivo sintetizado a partir de ácido láctico en el que la absorción de agua fue del 10%. Los autores notaron que los porcentajes moderados de absorción de agua mejoran el carácter hemostático de los materiales [Marques 2016].

El ángulo de contacto y el porcentaje de absorción proporcionan información acerca de la hidrofobicidad/hidrofilicidad y podría ser un indicador indirecto de la movilidad molecular de la superficie. La humectabilidad de la superficie puede afectar la adsorción de proteínas en la superficie y la biocompatibilidad [Sheikh 2016]. Esta es una de las razones por la cuales es indispensable realizar un estudio de la biocompatibilidad de los materiales para determinar la posible aceptación de los mismos en el cuerpo humano. Por lo anterior, los PUs sintetizados en este estudio pueden sugerirse como candidatos en aplicaciones biomédicas, como materiales para suturas no absorbibles teniendo en cuenta los valores de absorción de agua bajo las condiciones del ensayo.

2.4.5 Determinación de densidad

La densidad de los materiales sintetizados con IPDI y las concentraciones más altas de PCL y Ch se presenta en la Figura 15.

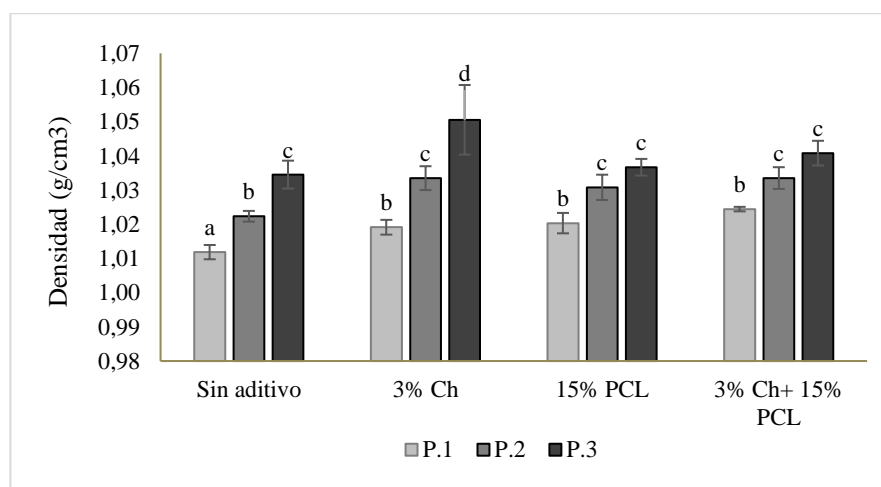


Figura 15. Densidad de los PUs sintetizados con IPDI y con 3% Ch y 15% PCL para cada polirol empleado. Los datos están presentados como la media \pm SD (n=3). Barras con letras diferentes (a, b, c, d, e, f) indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Según se observa en la Figura 15, la densidad de los PUs depende del tipo de polirol empleado, lo que coincide con los resultados presentados sobre las propiedades mecánicas y térmicas. A medida que incrementa la densidad de entrecruzamiento, se incrementa la

densidad del material polimérico resultante de forma significativa, aunque la diferencia entre el valor más alto y el más bajo es inferior al 5%. Esto está de acuerdo con los resultados de Conejero-García *et al.* (2017) quienes sintetizaron poliglicerol sebacato con distinto grado de entrecruzamiento como material para diversas aplicaciones en el campo de la ingeniería tisular. Los valores de densidad reportados por los autores oscilan entre 1,13 y 1,14 g ml⁻¹ [Conejero-García 2017].

Las altas densidades de materiales poliméricos se pueden relacionar con un mayor contenido de hidroxilo (OH) debido al aumento de las reacciones de reticulación [Cariço 2016]. En la investigación realizada por Cariço *et al.* (2016) observaron que al aumentar el contenido de aceite de ricino en la formulación de espuma se incrementaba la densidad aparente, lo que sugiere que las cadenas de polímero estaban más empaquetadas con menor volumen libre y células más pequeñas, lo que a su vez aumentaba la rigidez de estos materiales [Cariço 2016].

2.4.6 Análisis térmico dinamo-mecánico (DMTA)

La Figura 16 presenta el comportamiento dinámico, DMTA, en modo de tensión de los PUs correspondientes a la evolución del módulo y el factor de pérdida frente a la temperatura.

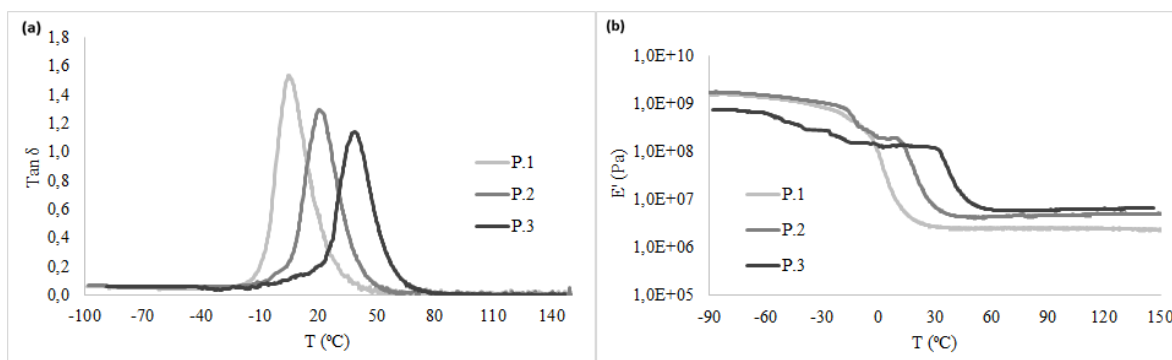


Figura 16. Termogramas DMTA de PUs sintetizados con IPDI según el polioli.
(a) Factor de pérdida, (b) Módulo de almacenamiento.

Con la variación del módulo de almacenamiento y el factor de pérdida se pudo observar los desplazamientos que sufre la T_g para los materiales evaluados. Se puede observar que la T_g incrementa cuando se utiliza el polioli P.2 y P.3; esto probablemente sea por la rigidez de la estructura y la mayor generación de puentes de hidrógeno, debido al elevado índice hidroxilo presente en el polioli [Chen 2018, Gurunathan 2015]. Con lo anterior se podría

inferir que la compatibilidad de los materiales disminuye con el polirol sin modificaciones y por ende con menor grado de entrecruzamiento.

Resultados con una tendencia similar fueron encontrados por Chen *et al.* (2018) sobre matrices de PU sintetizados con PCL como polirol, IPDI y PLA. Los autores reportaron que cuando la movilidad de la cadena disminuía, el valor de la T_g incrementaba. Por lo tanto, observaron que la compatibilidad de las fases disminuía al incrementar el contenido de PCL por un posible efecto plastificante de material no reticulado [Chen 2018].

Un comportamiento similar se presenta con los resultados del módulo. Se observa que los valores más bajos corresponden a los materiales sintetizados con P.1 (polirol sin modificación), comparado con los polioles P.2 y P.3 que presentan un contenido superior de grupos hidroxilo. Cuando el contenido de grupos hidroxilo aumenta, se genera un incremento del grado de entrecruzamiento, lo que a su vez dificulta la movilidad de las cadenas del polímero y por ende el módulo de almacenamiento aumenta. Una disminución en la movilidad de la cadena polimérica puede limitar la transferencia y difusión de energía, y esto podría disminuir la capacidad de absorción de la resistencia al impacto y la deformación [Chen 2018].

La relación entre los segmentos duros y blandos es importante ya que actúan como un agente reticulador físico y a la vez actúan como un relleno de alto módulo. Cuando existe una organización de los segmentos duros y blandos en los respectivos dominios, los prepolímeros tienden a presentar dos T_g . Una temperatura será negativa y corresponde a los segmentos blandos, mientras que la otra será positiva y corresponde a los segmentos duros [Gurunathan 2015]. Al presentarse un único evento de T_g se podría inferir que existe una distribución homogénea de las fases [Gurunathan 2015]. De acuerdo con los resultados obtenidos por medio del DSC, se puede observar que la tendencia de la T_g es similar, es decir, solo se presenta un valor de T_g y este incrementa a medida que se modifica el polirol. La presencia de una sola transición se puede relacionar con la existencia de una fase dominante, por lo que se puede inferir que existe una distribución uniforme de los componentes [Fuentes 2011]. La diferencia de T_g entre los polioles empleados puede deberse a la densidad de entrecruzamiento, ya que se generaría una compatibilidad entre segmentos duros y blandos mayor [Gurunathan 2015].

2.4.7 Microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM)

La morfología de los PUs sintetizados con IPDI como función del tipo de polioliol y los aditivos se presenta en la Figura 17.

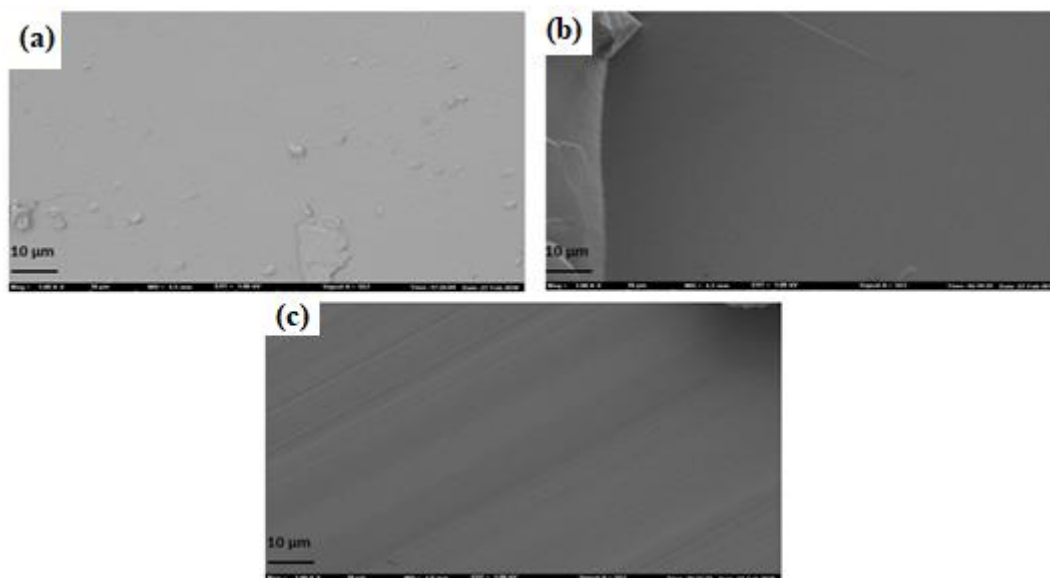


Figura 17. Micrografías FESEM de PUs sintetizados con IPDI a 100x.
(a) P.1, (b) P.2, (c) P.3.

En las micrografías FESEM se puede notar una distribución uniforme de los PUs, pero no es posible identificar los segmentos duros de los segmentos blandos. De igual forma no se observan diferencias relacionadas con el tipo de polioliol empleado para la matriz polimérica. Lo anterior se puede correlacionar con los resultados calorimétricos, ya que si existe una sola T_g es probable que exista una distribución homogénea de las fases. Esto coincide con los resultados presentados por Thakur *et al.* (2017), quienes observaron PUs sintetizados con aceite de higuera y diisocianato de tolueno para recubrimiento de materiales [Thakur 2017].

2.5 CONCLUSIONES

Se sintetizaron 144 PUs con polioliol derivados del aceite de higuera, e IPDI, HDI y HMDI, con adición de PCL y Ch. Se evaluaron las propiedades fisicoquímicas, mecánicas, térmicas y morfológicas de los materiales en función de la estructura química de los monómeros empleados para la síntesis. El tipo de diisocianato, el tipo de polioliol y la concentración de PCL presentaron interacción significativa sobre el esfuerzo máximo, el porcentaje de elongación, y el ángulo de contacto. Se observó que la adición de PCL

disminuía las propiedades mecánicas y el carácter hidrofílico de los PUs. La concentración de Ch no presentó efecto significativo sobre las propiedades evaluadas. La modificación química de los polioles mejora las propiedades evaluadas debido a la estructura del diisocianato y al incremento del entrecruzamiento de los materiales resultantes. De acuerdo con los resultados presentados sobre las propiedades mecánicas de los PUs, se puede corroborar la dependencia de las mismas a la presencia de puentes de hidrógeno, la cantidad de grupos hidroxilo en los polioles, la estructura molecular de los diisocianatos y las interacciones entre los segmentos duros y blandos de la matriz. Es así como el polirol con mayor índice hidroxilo, junto con los diisocianatos alifáticos cíclicos, presentaron los valores más elevados de propiedades mecánicas y térmicas. De forma general, los PUs que presentaron los mejores valores de las diversas propiedades evaluadas bajo las condiciones de los ensayos fueron los sintetizados con IPDI y polioles derivados del aceite de higuera. Por ejemplo, la elevada flexibilidad, que es uno de los factores determinantes para la selección de materiales aptos para suturas no-absorbibles. Los valores del módulo de Young se encontraron dentro del rango óptimo para el diseño de biomateriales para ser usados en tejidos como la piel. El porcentaje de elongación, con un máximo de 265%, indicaron que es posible obtener materiales resistentes con flexibilidad, lo que permite diseñar biomateriales que no causen lesiones a los tejidos suaves. Al relacionar la estructura de los monómeros empleados con las propiedades de las matrices sintetizadas con IPDI, se podría considerar a estos PUs como candidatos en aplicaciones biomédicas como materiales para suturas no-absorbibles.

2.6 BIBLIOGRAFÍA

- Anirudhan, T. S., Nair, S. S., & Nair, A. S. (2016). Fabrication of a bioadhesive transdermal device from chitosan and hyaluronic acid for the controlled release of lidocaine. *Carbohydrate Polymers*, 152, 687–698.
- Arévalo, F., Uscategui, Y. L., Diaz, L., Cobo, M., & Valero, M. F. (2016). Effect of the incorporation of chitosan on the physico-chemical, mechanical properties and biological activity on a mixture of polycaprolactone and polyurethanes obtained from castor oil. *Journal of Biomaterials Applications*, 31(5), 708–720.
- Aung, M. M., Yaakob, Z., Kamarudin, S., & Abdullah, L. C. (2014). Synthesis and

- characterization of Jatropha (*Jatropha curcas* L.) oil-based polyurethane wood adhesive. *Industrial Crops and Products*, 60, 177–185.
- Bakhshi, H., Yeganeh, H., Yari, A., & Nezhad, S. K. (2014). Castor oil-based polyurethane coatings containing benzyl triethanol ammonium chloride: synthesis, characterization, and biological properties. *Journal of Materials Science*, 49(15), 5365–5377.
- Basak, P., & Adhikari, B. (2012). Effect of the solubility of antibiotics on their release from degradable polyurethane. *Materials Science and Engineering C*, 32(8), 2316–2322.
- Bat, E., Zhang, Z., Feijen, J., Grijpma, D. W., & Poot, A. a. (2014). Biodegradable elastomers for biomedical applications and regenerative medicine. *Regenerative Medicine*, 9(3), 385–98.
- Borrero-López, A. M., Valencia, C., & Franco, J. M. (2017). Rheology of lignin-based chemical oleogels prepared using diisocyanate crosslinkers: Effect of the diisocyanate and curing kinetics. *European Polymer Journal*, 89, 311–323.
- Braun, U., Lorenz, E., Weimann, C., Sturm, H., Karimov, I., Ettl, J., ... Wildgruber, M. (2016). Mechanic and surface properties of central-venous port catheters after removal: a comparison of polyurethane and silicon rubber materials. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 64, 281–291.
- Cakić, S. M., Ristić, I. S., Cincović, M. M., Nikolić, N. C., Nikolić, L., & Cvetinović, M. J. (2017). Synthesis and properties biobased waterborne polyurethanes from glycolysis product of PET waste and poly (caprolactone) diol. *Progress in Organic Coatings*, 105, 111–122.
- Carriço, C. S., Fraga, T., & Pasa, V. M. D. (2016). Production and characterization of polyurethane foams from a simple mixture of castor oil , crude glycerol and untreated lignin as bio-based polyols. *European Polymer Journal*, 85, 53–61.
- Chan-Chan, L. H., Solis-Correa, R., Vargas-Coronado, R. F., Cervantes-Uc, J. M., Cauch-Rodríguez, J. V., Quintana, P., & Bartolo-Pérez, P. (2010). Degradation studies on segmented polyurethanes prepared with HMDI, PCL and different chain extenders. *Acta Biomaterialia*, 6(6), 2035–2044.
- Chashmejahanbin, M. R., Daemi, H., Barikani, M., & Salimi, A. (2014). Noteworthy impacts of polyurethane-urea ionomers as the efficient polar coatings on adhesion strength of plasma treated polypropylene. *Applied Surface Science*, 317, 688–695.

- Chen, H., Yu, X., Zhou, W., Peng, S., & Zhao, X. (2018). Highly toughened polylactide (PLA) by reactive blending with novel polycaprolactone-based polyurethane (PCLU) blends. *Polymer Testing*, 70(July), 275–280.
- Conejero-García, Á., Gimeno, H. R., Sáez, Y. M., Vilariño-Feltrer, G., Ortuño-Lizarán, I., & Vallés-Lluch, A. (2017). Correlating synthesis parameters with physicochemical properties of poly(glycerol sebacate). *European Polymer Journal*, 87, 406–419.
- Corcuera, M. A., Rueda, L., Fernandez d'Arlas, B., Arbelaiz, A., Marieta, C., Mondragon, I., & Eceiza, A. (2010). Microstructure and properties of polyurethanes derived from castor oil. *Polymer Degradation and Stability*, 95(11), 2175–2184.
- Członka, S., Bertino, M. F., & Strzelec, K. (2018). Rigid polyurethane foams reinforced with industrial potato protein. *Polymer Testing*, 68(April), 135–145.
- Dulińska-Molak, I., Lekka, M., & Kurzydłowski, K. J. (2013). Surface properties of polyurethane composites for biomedical applications. *Applied Surface Science*, 270, 553–560.
- Ferreira, P., Pereira, R., Coelho, J. F. J., Silva, A. F. M., & Gil, M. H. (2007). Modification of the biopolymer castor oil with free isocyanate groups to be applied as bioadhesive. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40(2), 144–152.
- Fuentes, L. E., Pérez, S., Martínez, S. I., & García, Á. R. (2011). Redes poliméricas interpenetradas de poliuretano a partir de aceite de ricino modificado y poliestireno: miscibilidad y propiedades mecánicas en función de la composición. *Revisata Ion*, 24(2), 45–50.
- Garg, B., Sandhu, V., Sood, N., Sood, A., & Malhotra, V. (2012). Histopathological analysis of chronic gastritis and correlation of pathological features with each other and with endoscopic findings. *Polish Journal of Pathology*, 63(3), 172–178.
- Gossart, A., Battiston, K. G., Gand, A., Pauthe, E., & Santerre, J. P. (2018). Mono vs multilayer fibronectin coatings on polar/hydrophobic/ionic polyurethanes: Altering surface interactions with human monocytes. *Acta Biomaterialia*, 66, 129–140.
- Gunatillake, P., Mayadunne, R., & Adhikari, R. (2006). Recent developments in biodegradable synthetic polymers. *Biotechnology Annual Review*, 12(06), 301–47.
- Gurunathan, T., Mohanty, S., & Nayak, S. K. (2015). Isocyanate terminated castor oil-based polyurethane prepolymer: Synthesis and characterization. *Progress in Organic Coatings*,

80, 39–48.

- Hejna, A., Kirpluks, M., Kosmela, P., Cabulis, U., Haponiuk, J., & Piszczyk, Ł. (2017). The influence of crude glycerol and castor oil-based polyol on the structure and performance of rigid polyurethane-polyisocyanurate foams. *Industrial Crops and Products*, 95, 113–125.
- Hormaiztegui, M. E. V., Aranguren, M. I., & Mucci, V. L. (2018). Synthesis and characterization of a waterborne polyurethane made from castor oil and tartaric acid. *European Polymer Journal*, 102(March), 151–160.
- Hou, Z., Zhang, H., Qu, W., Xu, Z., & Han, Z. (2016). Biomedical segmented polyurethanes based on polyethylene glycol, poly(ϵ -caprolactone-co- D,L -lactide), and diurethane diisocyanates with uniform hard segment: synthesis and properties. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 65(18), 947–956.
- Jutrzenka Trzebiatowska, P., Santamaria Echart, A., Calvo Correias, T., Eceiza, A., & Datta, J. (2018). The changes of crosslink density of polyurethanes synthesised with using recycled component. Chemical structure and mechanical properties investigations. *Progress in Organic Coatings*, 115(November 2017), 41–48.
- Kanmani, P., & Rhim, J.-W. (2014). Physical, mechanical and antimicrobial properties of gelatin based active nanocomposite films containing AgNPs and nanoclay. *Food Hydrocolloids*, 35, 644–652.
- Kaur, G., Mahajan, M., & Bassi, P. (2013). Derivatized Polysaccharides: preparation, characterization, and application as bioadhesive polymer for drug delivery. *International Journal of Polymeric Materials*, 62(9), 475–481.
- Kim, H., Kang, D.-H., Kim, M., Jiao, A., Kim, D.-H., & Suh, K.-Y. (2012). Patterning methods for polymers in cell and tissue engineering, 40(6), 1–29.
- Laube, T., Weisser, J., Berger, S., Börner, S., Bischoff, S., Schubert, H., Schnabelrauch, M. (2017). In situ foamable, degradable polyurethane as biomaterial for soft tissue repair. *Materials Science and Engineering C*, 78, 163–174.
- Liu, Y., Inoue, Y., Sakata, S., Kakinoki, S., Yamaoka, T., & Ishihara, K. (2014). Effects of molecular architecture of phospholipid polymers on surface modification of segmented polyurethanes. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25(5), 474–486.
- Marques, D. S., Santos, J. M. C., Ferreira, P., Correia, T. R., Correia, I. J., Gil, M. H., &

- Baptista, C. M. S. G. (2016). Photocurable bioadhesive based on lactic acid. *Materials Science and Engineering C*, 58, 601–609.
- Mekewi, M. A., Ramadan, A. M., ElDarse, F. M., Abdel Rehim, M. H., Mosa, N. A., & Ibrahim, M. A. (2017). Preparation and characterization of polyurethane plasticizer for flexible packaging applications: Natural oils affirmed access. *Egyptian Journal of Petroleum*, 26(1), 9–15.
- Meneguelli de Souza, L. C., de Carvalho, L. P., Araújo, J. S., de Melo, E. J. T., & Machado, O. L. T. (2018). Cell toxicity by ricin and elucidation of mechanism of Ricin inactivation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113(1), 821–828.
- Mi, H. Y., Jing, X., Hagerty, B. S., Chen, G., Huang, A., & Turng, L. S. (2017). Post-crosslinkable biodegradable thermoplastic polyurethanes: Synthesis, and thermal, mechanical, and degradation properties. *Materials and Design*, 127(February), 106–114.
- Morrall-Ruiz, G., Melgar-Lesmes, P., García, M. L., Solans, C., & García-Celma, M. J. (2014). Polyurethane and polyurea nanoparticles based on polyoxyethylene castor oil derivative surfactant suitable for endovascular applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 461(1–2), 1–13.
- Murray, K. A., Kennedy, J. E., McEvoy, B., Vrain, O., Ryan, D., Cowman, R., & Higginbotham, C. L. (2013). The influence of electron beam irradiation conducted in air on the thermal, chemical, structural and surface properties of medical grade polyurethane. *European Polymer Journal*, 49(7), 1782–1795.
- Omonov, T. S., Kharraz, E., & Curtis, J. M. (2017). Camelina (Camelina Sativa) oil polyols as an alternative to Castor oil. *Industrial Crops and Products*, 107(May), 378–385.
- Park, H., Gong, M.-S., Park, J.-H., Moon, S.-I., Wall, I. B., Kim, H.-W., ... Knowles, J. C. (2013). Silk fibroin-polyurethane blends: physical properties and effect of silk fibroin content on viscoelasticity, biocompatibility and myoblast differentiation. *Acta Biomaterialia*, 9(11), 8962–71.
- Pergal, M. V, Antic, V. V, Tovilovic, G., Nestorov, J., Vasiljevic-Radovic, D., & Djonlagic, J. (2012). In Vitro Biocompatibility Evaluation of Novel Urethane–Siloxane Co-Polymers Based on Poly(ϵ -Caprolactone)-block-Poly(Dimethylsiloxane)-block-Poly(ϵ -Caprolactone). *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 23(13), 1629–1657.
- Qiu, H., Li, D., Chen, X., Fan, K., Ou, W., Chen, K. C., & Xu, K. (2013). Synthesis,

- characterizations, and biocompatibility of block poly(ester-urethane)s based on biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) (P3/4HB) and poly(ϵ -caprolactone). *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 101(1), 75–86.
- Rezvanain, M., Ahmad, N., Mohd Amin, M. C. I., & Ng, S. F. (2017). Optimization, characterization, and in vitro assessment of alginate-pectin ionic cross-linked hydrogel film for wound dressing applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 131–140.
- Sáenz-Pérez, M., Lizundia, E., Laza, J. M., García-Barrasa, J., Vilas, J. L., & León, L. M. (2016). Methylene diphenyl diisocyanate (MDI) and toluene diisocyanate (TDI) based polyurethanes: thermal, shape-memory and mechanical behavior. *RSC Adv.*, 6(73), 69094–69102.
- Saikia, A., & Karak, N. (2017). Renewable resource based thermostable tough hyperbranched epoxy thermosets as sustainable materials. *Polymer Degradation and Stability*, 135, 8–17.
- Shah, S. A. A., Imran, M., Lian, Q., Shehzad, F. K., Athir, N., Zhang, J., & Cheng, J. (2018). Curcumin incorporated polyurethane urea elastomers with tunable thermo-mechanical properties. *Reactive and Functional Polymers*, 128(May), 97–103.
- Sheikh, Z., Khan, A. S., Roohpour, N., Glogauer, M., & Rehman, I. U. (2016). Protein adsorption capability on polyurethane and modified-polyurethane membrane for periodontal guided tissue regeneration applications. *Materials Science and Engineering C*, 68, 267–275.
- Shourgashti, Z., Khorasani, M. T., & Khosroshahi, S. M. E. (2010). Plasma-induced grafting of polydimethylsiloxane onto polyurethane surface: characterization and in vitro assay. *Radiation Physics and Chemistry*, 79(9), 947–952.
- Simón-Allué, R., Pérez-López, P., Sotomayor, S., Peña, E., Pascual, G., Bellón, J. M., & Calvo, B. (2014). Short- and long-term biomechanical and morphological study of new suture types in abdominal wall closure. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 37, 1–11.
- Špírková, M., Serkis, M., Pořeba, R., Machová, L., Hodan, J., Kredatusová, J., ... Zhigunov, A. (2016). Experimental study of the simulated process of degradation of polycarbonate- and d,l-lactide-based polyurethane elastomers under conditions mimicking the

- physiological environment. *Polymer Degradation and Stability*, 125, 115–128.
- Temenoff, J. S., & Mikos, A. G. (2008). *Biomaterials*. (Pearson, Ed.). Upper Saddle River, N.J.: Pearson/Prentice Hall.
- Thakur, S., & Hu, J. (2017). Polyurethane : A Shape Memory Polymer (SMP). In F. Yilmaz (Ed.), *Polyurethane*. InTechOpen.
- Thakur, S., & Karak, N. (2013). Castor oil-based hyperbranched polyurethanes as advanced surface coating materials. *Progress in Organic Coatings*, 76(1), 157–164.
- Uscátegui, Y., Arévalo, F., Díaz, L., Cobo, M., & Valero, M. (2016). Microbial degradation, cytotoxicity and antibacterial activity of polyurethanes based on modified castor oil and polycaprolactone. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 27(18), 1860–1879.
- Usman, A., Zia, K. M., Zuber, M., Tabasum, S., Rehman, S., & Zia, F. (2016). Chitin and chitosan based polyurethanes: a review of recent advances and prospective biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 630–645.
- Valero, M. F., & Díaz, L. E. (2014). Poliuretanos obtenidos a partir de aceite de higuera modificado y poli-isocianatos de lisina: síntesis, propiedades mecánicas y térmicas y degradación in vitro. *Química Nova*, 37(9), 1441–1445.
- Valero, M. F., & Ortigón, Y. (2015). Polyurethane elastomers-based modified castor oil and poly(ϵ -caprolactone) for surface-coating applications: synthesis, characterization, and in vitro degradation. *Journal of Elastomers and Plastics*, 47(4), 360–369.
- Valero, M. F., Pulido, J. E., Ramírez, Á., & Cheng, Z. (2009). Determinación de la densidad de entrecruzamiento de poliuretanos obtenidos a partir de aceite de ricino modificado por transesterificación. *Polímeros*, 19(1), 14–21.
- Vannozzi, L., Ricotti, L., Santaniello, T., Terencio, T., Oropesa-Nunez, R., Canale, C., ... Gerges, I. (2017). 3D porous polyurethanes featured by different mechanical properties: Characterization and interaction with skeletal muscle cells. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 75(July), 147–159.
- Vroman, I., & Tighzert, L. (2009). Biodegradable polymers. *Materials*, 2(2), 307–344.
- Wolf, M. T., Dearth, C. L., Sonnenberg, S. B., Lobo, E. G., & Badylak, S. F. (2015). Naturally derived and synthetic scaffolds for skeletal muscle reconstruction. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 84, 208–221.
- Wu, C.-S. (2016). Enhanced antibacterial activity, antioxidant and in vitro biocompatibility

- of modified polycaprolactone-based membranes. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 65(17), 872–880.
- Wu, H., Williams, G. R., Wu, J., Wu, J., Niu, S., Li, H., ... Zhu, L. (2018). Regenerated chitin fibers reinforced with bacterial cellulose nanocrystals as suture biomaterials. *Carbohydrate Polymers*, 180(June 2017), 304–313.
- Yoshida, K., Jiang, H., Kim, M. J., Vink, J., Cremers, S., Paik, D., ... Myers, K. (2014). Quantitative evaluation of collagen crosslinks and corresponding tensile mechanical properties in mouse cervical tissue during normal pregnancy. *PLoS ONE*, 9(11).
- Zhang, C., Garrison, T. F., Madbouly, S. A., & Kessler, M. R. (2017). Recent advances in vegetable oil-based polymers and their composites. *Progress in Polymer Science*, 71, 91–143.

BIODEGRADABILIDAD Y BIOCOMPATIBILIDAD *IN VITRO* DE LOS MATERIALES PARA SUTURAS EN FUNCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LOS SEGMENTOS Y LA DENSIDAD DE ENTRECruzAMIENTO DE LOS POLIURETANOS

3.1 RESUMEN

Los poliuretanos (PUs) están generando un creciente interés en el campo biomédico debido a propiedades características, entre las que se pueden mencionar propiedades elásticas, biodegradabilidad y biocompatibilidad. El objetivo de este capítulo fue evaluar la respuesta biológica de los PUs sintetizados con polioles derivados del aceite de higuera (*Ricinus communis*) con diisocianato de isoforona (IPDI), policaprolactona diol (PCL) (15% p/p) y quitosano (Ch) (3% p/p). Se evaluó la degradación *in vitro* en medio ácido y básico, degradación enzimática por medio de una esterasa de hígado de cerdo. Se determinó la viabilidad celular *in vitro* usando la línea celular de fibroblastos de ratón L-929 (ATCC® CCL-1), la línea celular de fibroblastos humanos MRC-5 (ATCC® CCL-171™) y la línea celular de fibroblasto dérmico humano HDFa (ATCC® PCS-201-012™) sobre los materiales por el método ISO 10993-5. También se determinó la viabilidad mediante el kit de LIVE/DEAD sobre fibroblastos de ratón L-929. La actividad antimicrobiana fue evaluada contra *Escherichia coli* (ATCC® 2469), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853). La modificación química del aceite de higuera no generó un efecto citotóxico en las líneas celulares probadas. La estructura celular no presenta variaciones con relación al control. Por otro lado, se determinó una estrecha relación entre la funcionalidad del polioliol y la inhibición bacteriana. Los PUs presentaron actividad antibacteriana por medio de la disminución de las unidades formadoras de colonias de las bacterias evaluadas. Se observó una disminución de un 67% para *E. coli*, un 55% para *S. aureus* y un 56% para *P. aeruginosa* después de 24 h. Los materiales evaluados se sugieren como candidatos para obtener materiales de suturas biomédicas no absorbibles, debido a las propiedades de biocompatibilidad presentadas en células inmortalizadas.

3.2 INTRODUCCIÓN

Los PUs son ampliamente utilizados en la preparación de dispositivos médicos debido a su biocompatibilidad, degradabilidad, y no toxicidad comparable con polímeros como el ácido poliláctico (PLA), policarbonato, policaprolactona (PCL), entre otros [Park 2013, Bakhshi 2014, Alishiri 2014, van Minnen 2006, Li 2007, Wang 2008, Estrada 2013, Kucinska-Lipka 2015, Tsai 2015, Zhou 2012]. La aplicabilidad de los PUs depende de las propiedades mecánicas, de adhesión y de superficie. El carácter degradable de los polímeros juega un papel importante para ciertas funciones específicas dentro del cuerpo humano [St John 2014, Chen 2014]. Como ejemplos de PUs en el campo biomédico se encuentran: implantes, válvulas artificiales para corazón, suturas, catéteres, corazón artificial, prótesis vasculares, recubrimientos para heridas, revestimientos compatibles con la sangre, sistemas de administración de fármacos, soportes porosos para regeneración de tejidos, entre otros [Park 2013, Rocco 2014, Rajan 2013, Rodríguez-Galán 2011, Adolph 2014].

Se entiende por degradación al proceso mediante el cual la estructura química del polímero experimenta cambios que se determinan por la variación de alguna de sus propiedades y que depende del tipo de medio que se utilice para degradar el polímero y el tiempo de ensayo [Rodríguez 2015]. El carácter degradable del PU depende de la estructura de los monómeros empleados [McBane 2011].

Actualmente también se estudia el desarrollo de polímeros con propiedades biocidas o con actividad antibacteriana que permitan disminuir el uso de agentes convencionales, es así como materiales poliméricos con actividad antimicrobiana se obtienen por medio de la modificación de los polímeros con grupos funcionales o con compuestos de bajo peso molecular que posean propiedades antimicrobianas [Larraza 2012, Wang 2015]. A pesar de los importantes avances en estos temas de investigación, aún son muchos los retos que se deben superar en el diseño de materiales en el campo de la biomedicina. Uno de los grandes retos es hacer uso de precursores de polímeros que sean obtenidos a partir de fuentes renovables como es el caso de los aceites vegetales, específicamente el aceite de higuera, el cual por el alto contenido del triglicérido de ácido ricinoléico permite obtener polioles con gran número de grupos hidroxilos reactivos mediante modificación química, lo que conlleva a un incremento en las propiedades mecánicas.

La biocompatibilidad se interpreta como una serie de interacciones que ocurren en la interfase tejido/material, permitiendo la identificación de aquellos materiales con características superficiales y/o química de polímeros más biocompatibles; estas interacciones están influenciadas por las características intrínsecas del material. Algunas pruebas de biocompatibilidad involucran pruebas analíticas o las observaciones de los fenómenos fisiológicos, reacciones o propiedades superficiales atribuibles a una aplicación específica [Morral-Ruíz 2014].

Los cultivos celulares son sistemas ideales para el estudio y observación de un determinado tipo de células bajo condiciones específicas, dado que estos sistemas no presentan la complejidad que un sistema *in vivo* conlleva, debido al gran número de variables que interaccionan. Los ensayos *in vitro* valoran la morfología, citotoxicidad y funciones secretoras de diferentes tipos de células. Los ensayos pueden ser por contacto directo de las células y el material o indirecto, adicionando un extracto del material al cultivo celular [Guelcher 2008, Aranguren 2012].

El objetivo de la investigación consistió en determinar la biodegradabilidad y biocompatibilidad *in vitro* de los materiales para suturas que presentaron propiedades fisicoquímicas, mecánicas y morfológicas deseables en función de la estructura de los segmentos y la densidad de entrecruzamiento de los PUs. En este estudio se utilizaron PUs sintetizados con aceite de hígado de cerdo (con y sin modificación química), con diisocianato de isoforona (IPDI), y con la adición de policaprolactona diol (PCL) (15% p/p) y quitosano (Ch) (3% p/p). Se determinó la degradación *in vitro* en medio ácido y básico, degradación enzimática por medio de una esterasa de hígado de cerdo. Se determinó la viabilidad celular *in vitro* usando fibroblastos de ratón L-929 (ATCC® CCL-1), fibroblastos humanos MRC-5 (ATCC® CCL-171™) y fibroblasto dérmico humano HDFa (ATCC® PCS-201-012™) sobre los PUs. También se determinó la viabilidad mediante el kit de LIVE/DEAD sobre fibroblastos de ratón L-929. Se evaluó la actividad antimicrobiana de los PUs sobre bacterias que comúnmente habitan en centros médicos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Y se investigó la citocompatibilidad de los extractos de degradación de estos PUs sobre fibroblastos de ratón NIH/3T3 (ATCC CRL-1658).

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Reactivos

Ácido clorhídrico (HCl) 0,1 M, NaOH 0,1 M, esterasa de hígado porcino (18 unidades mg^{-1}), DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) fueron adquiridos con Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Buffer fosfato salino (PBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio), tripsina 2,5% (10X), Penicilin-Streptomycin (10.000 Und de penicilina y 10.000 μg de estreptomycin por mililitro), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (1X), RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit, Alexa Flour™ 488 phalloidin, fueron marca Gibco/Invitrogen, Paisley, UK. Suero fetal bovino (FBS) marca Eurobio (Les Ulis, France). Caldo tripticasa soya (TSB), Agar tripticasa soya (TSA) y agua desionizada marca Scharlau Co (España).

3.3.2 Material biológico

Fibroblastos de tejido conectivo subcutáneo de ratón L-929 (ATCC® CCL-1). Fibroblasto embrionario de ratón NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™). Fibroblastos humanos de pulmón MRC-5 (ATCC® CCL-171™). Fibroblasto dérmico primario de humano HDFa (ATCC® PCS-201-012™). *Escherichia coli* (ATCC® 2469), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853). Todos los materiales biológicos fueron adquiridos de la biblioteca de cepas de la Universidad de La Sabana (Colombia).

3.3.3 Ensayos de biodegradabilidad *in vitro*

Los ensayos de biodegradabilidad se realizaron en ensayos independientes por triplicado de acuerdo con lo descrito en la norma ASTM F1635-11. Para remover cadenas no entrecruzadas y residuos de monómeros, los PUs se lavaron con etanol durante dos días, renovando el etanol cada día. Después el solvente se reemplazó por agua desionizada durante dos días más. Los materiales se secaron en cámara de vacío a 37 °C durante 24 h [Conejero-García 2017]. Muestras de 5 mm \times 5 mm \times 3 mm se colocaron en los medios de biodegradación y se incubaron a 37 °C durante tres meses a excepción del medio enzimático (10 unidades mg^{-1} sólido) que fue por un período de 21 días. Luego de este tiempo, las muestras se lavaron con agua destilada, se secaron en cámara de vacío y se pesaron. Los

medios de biodegradación fueron: medio ácido HCl 0,1 M, medio básico NaOH 0,1 M, y medio enzimático de esterasa de hígado porcino. El porcentaje de biodegradación se calculó comparando el peso seco (W_f) de la muestra después de la degradación durante el tiempo predeterminado con el peso seco original (W_i) de la muestra usando la ecuación 3 (Ec. 3) [Basak 2012, Wang 2015]:

$$\% \text{ degradación de PUs} = \frac{W_i - W_f}{W_i} * 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

3.3.4 Ensayo *in vitro* de viabilidad celular por el método MTT

Fibroblastos de ratón L-929 y fibroblastos humanos MRC-5 y HDFa fueron cultivadas en DMEM, suplementado con suero fetal bovino (10%) y penicilina-streptomina (1%) en frascos de cultivo celular T75. Se cultivaron a 37 °C y 5% de CO₂. Se realizó cambio de medio a las células cada 48 h [Rezvanain 2017]. A una confluencia del 100 %, las células se tripsinizaron (tripsina EDTA) para análisis de viabilidad.

El efecto de los poliuretanos sobre la viabilidad celular se evaluó con el método MTT definido por la norma ISO/CD 10993-5. En platos de 96 pocillos se sembraron células a una concentración de 4,0E+04 células por pozo con medio suplementado a 37 °C y 5% CO₂ durante 24 h. Luego se colocaron cilindros de PUs de 3 mm × 2 mm (diámetro × alto) previamente esterilizados con luz UV (260 nm) durante 30 min por cada lado [Vannozzi 2017], con 100 µL de medio suplementado. Los materiales se dejaron en contacto con los polímeros durante 24 h a 37 °C y 5% CO₂. Luego el sobrenadante y los polímeros fueron removidos y se adicionó solución MTT (12 mM en PBS) en volumen total de 100 µL durante 4 h a 37 °C. El sobrenadante se retiró y se adicionaron 100 µL de dimetilsulfóxido incubando por 15 min a 37 °C. Luego se determinó la densidad óptica en un lector de placas (Bio-Tek ELx800 Microplate Reader) a 570 nm. Como control positivo se utilizó un biomaterial de polipropileno (PP) y como control negativo de la viabilidad se empleó doxorubicina (DOXO). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La viabilidad celular se determinó de acuerdo con la ecuación 4:

$$\% \text{Viabilidad celular} = \frac{DO_{\text{control}} - DO_{\text{muestra}}}{DO_{\text{control}}} * 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

donde DO_{muestra} corresponde a las células luego del tratamiento con el PU, y DO_{control} equivale a las células sin tratamiento.

3.3.5 Citotoxicidad de los subproductos de la degradación

Muestras de polímeros de 4 mm de diámetro para la prueba de citotoxicidad fueron esterilizadas con luz UV [Han 2012]. Para obtener el extracto se utilizaron tres muestras de cada composición de los polímeros en tubos de micro-centrífuga con 100 μL de D-MEM a 37 °C, 200 rpm por 30 días. Con 100 μL de sobrenadante se determinó la citotoxicidad de los productos de degradación por medio del ensayo MTT según metodología del ítem anterior. La citotoxicidad de los productos de degradación fue evaluada con células de fibroblastos de ratón NIH/3T3 sembradas en placas de 96 pozos [Guan 2004] ($4,0\text{E}+04$ células/pozo) con DMEM suplementado con FBS a 37 °C, 5% CO_2 por 24 h.

3.3.6 Técnicas inmunocitoquímicas

Ensayo de viabilidad celular in vitro por el kit de LIVE/DEAD. También se evaluó la viabilidad celular por medio del kit LIVE/DEAD basado en la integridad de la membrana plasmática y la actividad intracelular esterasa [Vilariño Feltrer 2016]. Fibroblastos de ratón L-929 fueron cultivadas en RPMI, suplementado con suero fetal bovino (10%) y penicilina-streptomycin (1%) en frascos de cultivo celular T75, a 37 °C y 5% de CO_2 . Se realizó cambio de medio a las células cada 48 h [Rezvanain 2017]. A una confluencia del 100 %, las células se tripsinizaron (tripsina EDTA) para análisis de viabilidad.

PUs lavados con etanol y agua durante 3 días y secados en cámara de vacío a 37 °C durante 24 h [Conejero-García 2017], se emplearon para este ensayo. En placas de 96 pocillos se colocaron láminas de PUs de 4 mm de diámetro previamente esterilizados con luz UV (260 nm) durante 30 min por cada lado [Vannozzi 2017]. 5 μL de células, a una concentración de $1,0\text{E}+04$ células ml^{-1} , se sembraron sobre cada material con medio suplementado a 37 °C y 5% CO_2 durante 30 min. Luego se adicionaron 95 μL de medio suplementado y se incubó por 24 h a 37 °C y 5% CO_2 [Conejero-García 2017]. Se retiró el sobrenadante y se adicionó solución de tinción compuesta por 2 μL de calceína AM (marcador para células vivas) y 4 μL del homodímero de etidio (marcador para células muertas), durante 20 min en la oscuridad y con agitación [Vilariño Feltrer 2016]. Se realizó la medición de fluorescencia para la calceína en un espectrofotómetro Victor Multilabel Counter 1420 (Perkin-Elmer) a 485 nm para determinar la concentración de células vivas. Como control positivo se utilizó

poliestireno (PS) y como control negativo se empleó látex. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Fijación y análisis morfológico con faloidina y DAPI. Los fibroblastos L-929 que estaban en contacto con el material luego de 24 h de incubación, se lavaron con PBS, y se fijaron durante 20 min con paraformaldehído 4% p/v a 20 °C. Luego se lavaron dos veces con PBS a 4 °C. Se adicionó faloidina (Alexa FlourTM 488 phalloidin), durante 20 min para revelar la actina-F. Se realizaron dos lavados con PBS. El núcleo de las células fue teñido por 5 min con DAPI en una dilución 1/5000 en PBS. Se realizaron dos lavados con PBS. Se adicionó azida de sodio 0,05%. Se realizó la observación de la estructura celular por medio de un microscopio óptico NIKON Eclipse 80i con un sistema de iluminación Nikon Intensilight [Conejero-García 2017]. Las imágenes se analizaron por medio del software ImageJ versión 1.45k.

3.3.7 Ensayo *in vitro* de actividad antibacteriana

Se determinó la actividad antibacteriana de los poliuretanos contra *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, siendo los principales agentes patógenos asociados a las infecciones de implantes [Wu 2016]. Se prepararon suspensiones bacterianas en TSB a 37 °C por 16 h. Alícuotas de la suspensión bacteriana se inocularon en TSB fresco a 37 °C por 6 h. Se retiraron las células bacterianas en una centrifuga a 3000 rpm por 10 min a 4°C. Se realizó lavado de las células 2 veces con PBS luego de remover los sobrenadantes. La suspensión bacteriana fue ajustada en PBS al estándar 0.5 de Mcfarland [Wu 2016]. PUs de 3 mm × 2 mm (diámetro × espesor) previamente esterilizados con luz UV (260 nm) durante 30 min por cada lado, se colocaron en placas de cultivo de 96 pocillos con 100 µL de suspensión bacteriana y se incubaron a 37 °C por 24 h. El contenido de cada pocillo fue transferido a tubos de micro-centrífuga que contenían 900 µL de PBS estéril. Por medio del conteo de colonias se determinó el número de células viables en la suspensión utilizando diluciones seriadas sembradas en TSA a 37 °C por 18 h. Una suspensión bacteriana sin polímero fue utilizada como control negativo. Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.3.8 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como valores promedios \pm desviación estándar (SD). Los datos fueron analizados por medio de un análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias significativas fueron determinadas para $p < 0,05$. Para la comparación entre muestras se utilizó la prueba t-Student con el Software SPSS Statistics 23.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Ensayos de biodegradabilidad *in vitro*

La biodegradabilidad de los PUs se evaluó en presencia de diferentes medios (HCl, NaOH y enzimático) durante un período de tiempo específico y los resultados se presentan en la Figura 18.

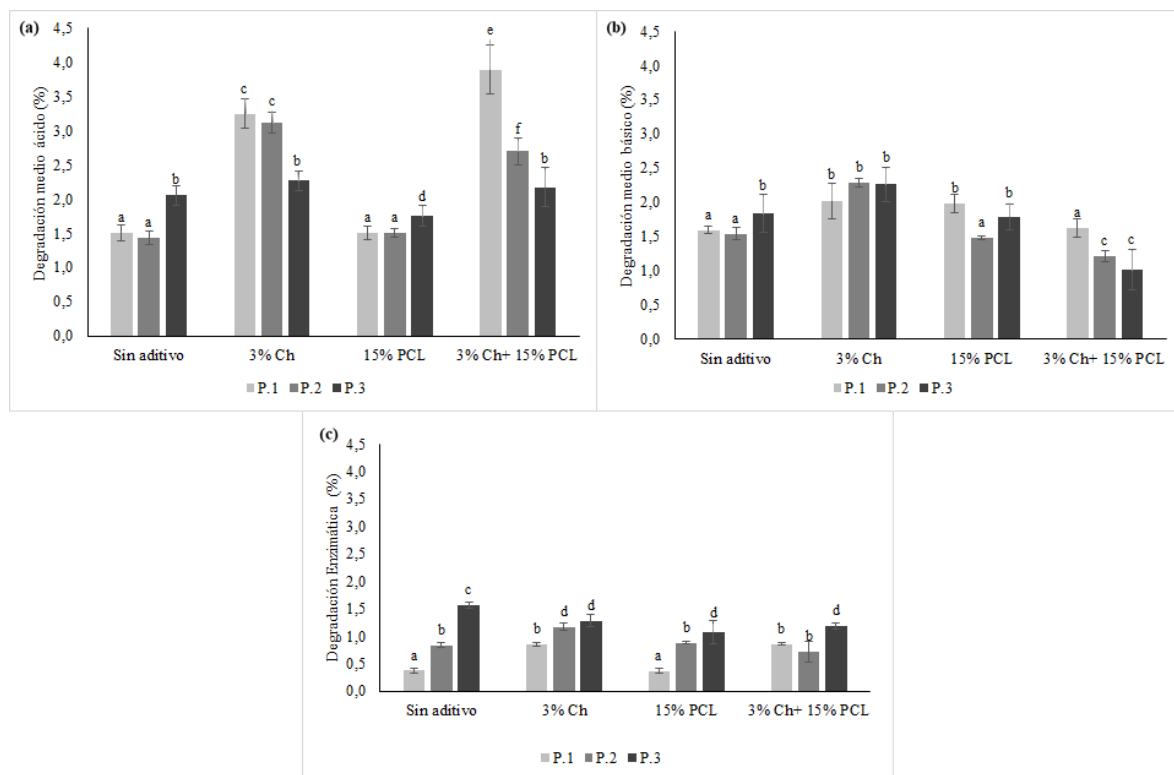


Figura 18. Porcentaje de degradación de los PUs en diferentes medios.

(a) Medio ácido (HCl 0,1M) durante 90 días, (b) Medio básico (NaOH 0,1M) durante 90 días, (c) Medio enzimático (esterasa) durante 21 días. Los datos están presentados como la media \pm SD (n=3). Barras con letras diferentes (a, b, c, d, e, f) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al tipo de polioli.

La PCL se utilizó como control positivo en la degradación enzimática, y luego de 21 días presentó una degradación de $9,08 \pm 0,30\%$. Se puede inferir que la estructura lineal de la PCL facilita que las cadenas escindidas puedan difundir a través del polímero y liberarse al medio generando un mayor porcentaje de degradación. Mientras que para los PUs sintetizados, que se caracterizan por ser materiales entrecruzados, la movilidad de las cadenas será menor y la difusión de las cadenas escindidas estará impedida.

El valor más alto del porcentaje de degradación después de 90 días de ensayo (medio ácido y básico) se obtuvo con el medio ácido, bajo las condiciones del ensayo para el material sintetizado con el polioli P.1 y con la mezcla de los aditivos (3% Ch y 15% PCL). Se determinó, por medio de FTIR de los materiales degradados (Figura 19), si la degradación correspondía a alguno de los grupos funcionales del material.

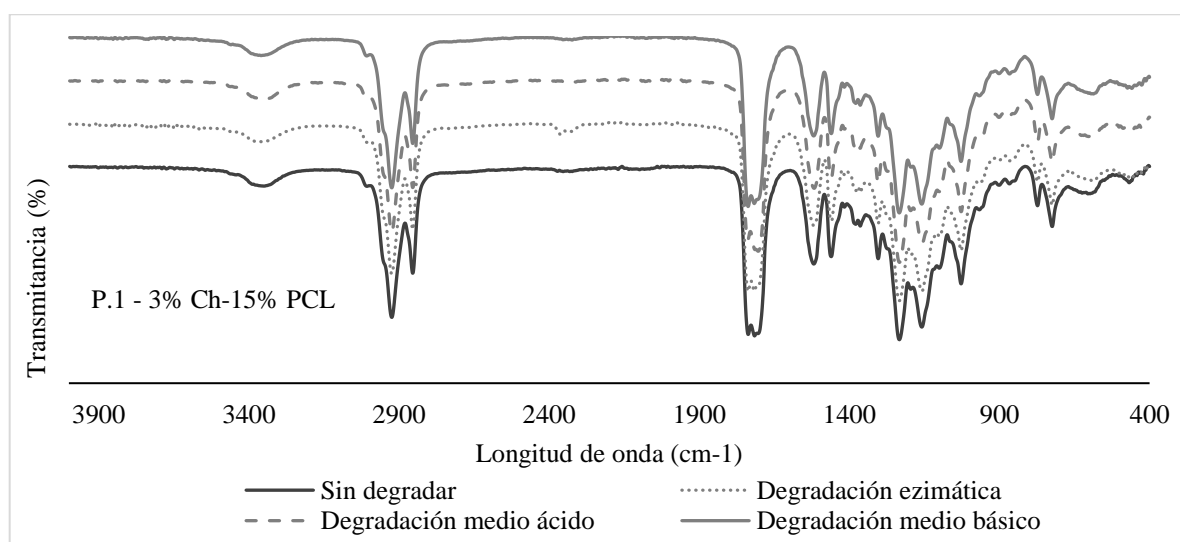


Figura 19. Espectros de FTIR de PUs degradados con medio ácido, básico y enzimático.

En la Figura 19 se observa que los grupos funcionales característicos de los PUs se conservan comparado con el material sin degradar, por lo tanto se puede inferir que la degradación se presenta a nivel superficial. De otro lado, también se tomaron imágenes superficiales de FESEM de los materiales degradados y se observa una posible degradación superficial de los materiales (Figura 20). Al observar que el porcentaje de degradación es inferior al 4% con los medios evaluados se puede decir que esto se debe al carácter

hidrofóbico de los PUs, lo que está acorde con los resultados encontrados en el capítulo 2 sobre el porcentaje de absorción de agua y el ángulo de contacto.

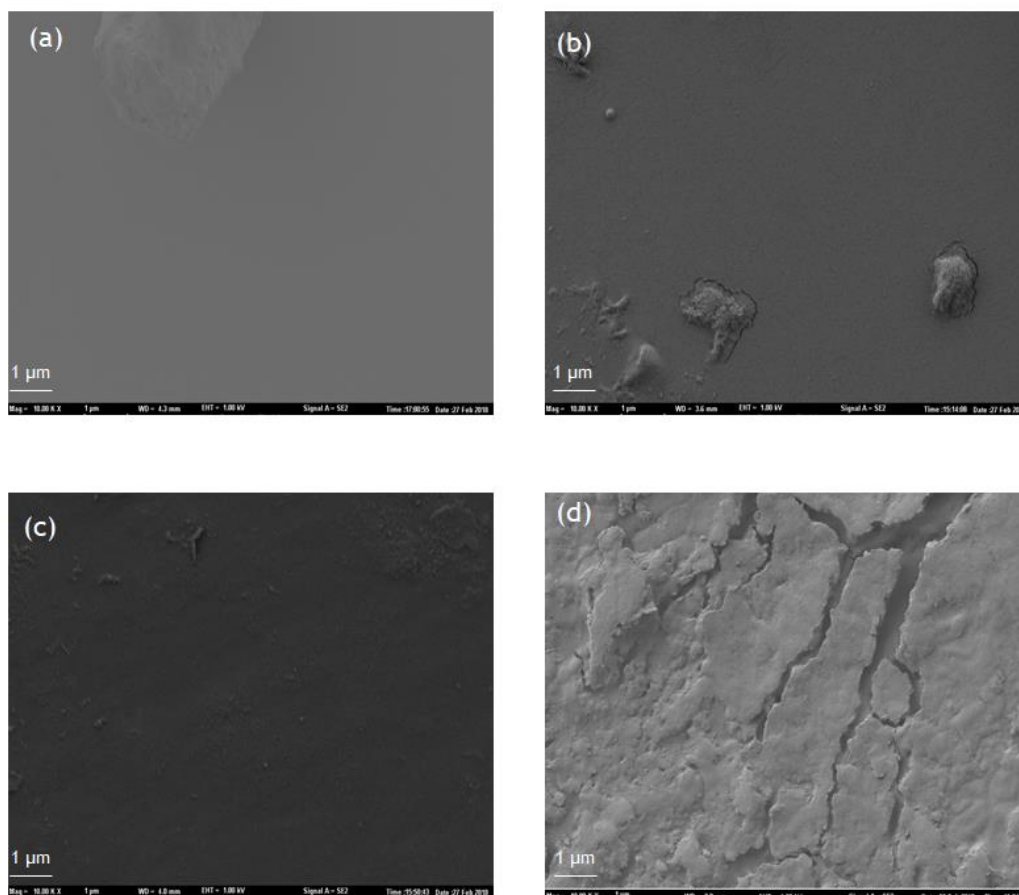


Figura 20. Micrografías FESEM del PU sintetizado con P.2-15%PCL-3%Ch luego del proceso de degradación en diferentes medios a 10000x.
(a) Material sin degradar, (b) Medio ácido (HCl 0,1M) luego de 90 días, (c) Medio básico (NaOH 0,1M) luego de 90 días, (d) Medio enzimático (esterasa) luego de 21 días.

Los resultados obtenidos en esta investigación presentan una tendencia similar con los presentados por Thakur *et al.* (2013) quienes evaluaron resistencia química de PUs con un medio ácido y otro básico y encontraron que en general los PUs presentan resistencia química, y los PUs a base de aceite de higuierilla presentaron mayor resistencia al medio básico ya que contiene grupos funcionales hidrolizables [Thakur 2013]. Este puede ser el motivo por el cual la biodegradación de los PUs en medio básico es menor que la de los mismos en medio ácido.

La degradación de poli(éster-uretano) se produce principalmente por un ataque hidrolítico del éster y el enlace uretano, respectivamente [Laube 2017]. Das *et al.* (2013) atribuyen la degradación en medios ácidos y básicos a la presencia de diferentes tipos de interacciones fuertes en las estructuras de los PUs [Das 2013]. Los autores afirman que la escasa resistencia a los álcalis se debe a la presencia de enlaces éster hidrolizables en la estructura de los restos monoglicéridos y PCL de los polímeros [Das 2013]. Luego de 90 días de ensayo se observa que los valores más altos del porcentaje de degradación, bajo las condiciones del ensayo, son relativamente bajos (3,9% en medio ácido y 2,3% en medio básico). Con lo anterior se puede inferir que los materiales poliméricos presentan una resistencia a la degradación debido a la estructura de los PUs, es decir a la matriz entrecruzada con elevadas propiedades mecánicas y con carácter hidrofóbico.

En cuanto a la degradación enzimática (Figura 18(c)) se observa que el porcentaje más elevado es de 1,6% luego de 21 días, lo que significa que se presenta un proceso de degradación superior que el que se obtiene con los otros tratamientos evaluados. Estos comportamientos pueden ser atribuidos a un incremento de los grupos hidroxilo en los polioles lo que genera un incremento en el entrecruzamiento físico del polímero y por lo tanto se tiene un aumento en los grupos uretano. Los enlaces uretanos son similares a las amidas y pueden ser hidrolizables por enzimas como la esterasa empleada en este ensayo [Cherng 2013, Spontón 2013]. Esto coincide con lo expuesto por Gogoi *et al.* (2014) donde se describe que la presencia de enlaces amida y urea presentes en la estructura ramificada del polímero facilita la degradación [Gogoi 2014]. Según Cherng, la degradación de los PUs es debida a la ruptura de enlaces hidrolíticamente débiles característicos de los segmentos suaves y por lo tanto concluyen que la velocidad de degradación *in vitro* depende principalmente del tipo de poliol utilizado en la síntesis por el tipo de enlaces éster que se encuentran en la estructura [Cherng 2013].

3.4.2 Ensayo *in vitro* de viabilidad celular por el método MTT

Como parte de la evaluación biológica *in vitro* de los PUs se determinó el porcentaje de viabilidad celular sobre tres líneas celulares de fibroblastos y los resultados se muestran en la Figura 21.

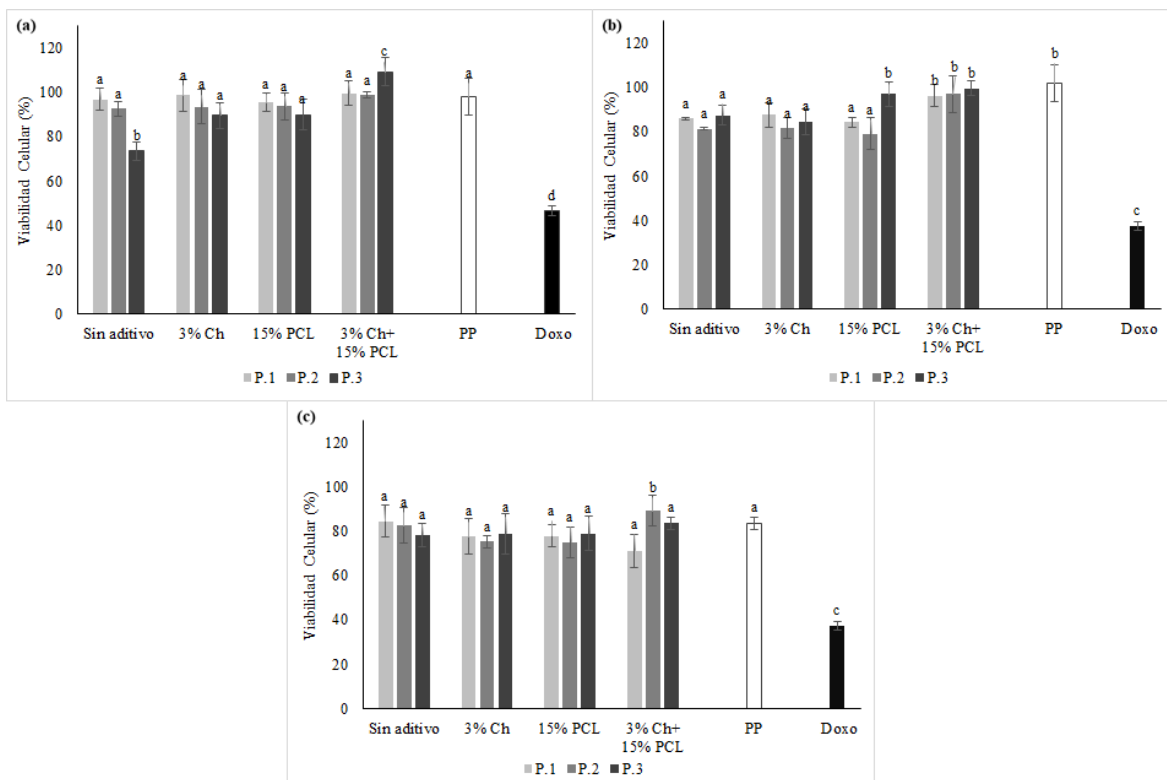


Figura 21. Porcentaje de viabilidad celular a 24 h.

(a) Fibroblastos de ratón L-929, (b) Fibroblastos humanos MRC-5, (c) Fibroblastos dérmicos humanos HDFa. Los datos están presentados como la media \pm SD (n=3). Barras con letras diferentes (a, b, c, d) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los polímeros.

En la Figura 21 se observa que todos los polímeros presentan viabilidad celular superior al 70% con los tres tipos de células evaluados. De acuerdo con la norma ISO/CD 10993-5 valores superiores al 70% se pueden considerar aptos para su aplicación como biomateriales ya que serían materiales no-citotóxicos. Como material de control se empleó un polipropileno (PP) por ser un biomaterial biocompatible y no absorbible. Y como control negativo se utilizó doxorubicina (Doxo). En la Figura 21(a) se presentan los resultados de viabilidad celular de los PUs sobre las células de fibroblastos L-929. Se observa que el porcentaje de viabilidad de todas las matrices a excepción del PU sintetizado con P.3 sin aditivo, no presentan diferencias estadísticas ($p < 0,05$) comparado con el PP. Para el PU sintetizado con P.3 se observan diferencias significativas con el polímero sintetizado con P.1 y con el control, pero los valores de viabilidad celular son aptos para proponer los materiales sintetizados como posibles biomateriales. La tendencia que se observa para los fibroblastos L-929 es que a medida que se incrementa el grado de entrecruzamiento del PU, se disminuye el porcentaje

de viabilidad celular. Es probable que el elevado grado de entrecruzamiento genere una baja disponibilidad de grupos funcionales, como grupos -OH, en el polímero entrecruzado, lo que podría disminuir la adhesión celular [Vannozzi 2017] mediada por las proteínas del medio, que previamente se adhieren sobre la superficie.

Bakhshi *et al.* (2014) evaluaron PUs sintetizados con adición de sales de amonio cuaternario en la epoxidación de aceite de soya y encontraron que los PUs presentan una viabilidad celular entre el 78-108% con fibroblastos de ratón L-929, demostrando que no existía toxicidad de los polímeros sintetizados, coincidiendo esto con los resultados de este ensayo [Bakhshi 2014].

Resultados similares fueron encontrados por Calvo-Correas *et al.* (2015), quienes en un estudio preliminar de citotoxicidad *in vitro* con células murinas L-929 determinaron que PUs sintetizados a partir de aceite de higuera y diisocianato de lisina presentaban una viabilidad celular superior al 100% en las primeras 24 h de ensayo, siguiendo el protocolo estándar de la norma ISO 10993-12, lo cual indicaba que los PUs sintetizados resultaban no tóxicos, mostrando un potencial uso en aplicaciones biomédicas [Calvo-Correas 2015]. De igual forma estos resultados coinciden con los reportados por Reddy *et al.*, quienes sintetizaron un PU a partir de diisocianato de lisina, PCL y 1,4-butanodiamida, y encontraron que los polímeros no presentaban toxicidad cuando estaban en contacto con fibroblastos de ratón NIH/3T3 [Reddy 2010b].

En la Figura 21(b) se presentan los resultados de viabilidad celular de los polímeros sobre los fibroblastos humanos MRC-5. Para esta línea celular no se observa alguna tendencia relacionada con el tipo de poliol empleado en la síntesis del PU. Se observa que el porcentaje de viabilidad disminuye comparado con el material control (PP), pero de igual forma los materiales son aptos para ser empleados en el diseño de biomateriales, ya que presentan valores superiores al 80% de viabilidad celular.

En la Figura 21(c) se encuentran los resultados de viabilidad celular de los PUs sobre los fibroblastos dérmicos humanos HDFa y se observa que los materiales presentan una viabilidad superior al 80%. En este caso no se presentan diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tipos de polioles empleados en la síntesis de los PUs. De igual forma se puede decir que no se encuentran diferencias estadísticas de los materiales sintetizados comparados con el material control del PP, con lo que se puede inferir que los PUs

sintetizados pueden emplearse para ser considerados en el diseño de biomateriales como materiales para suturas no absorbibles.

Los resultados anteriores son similares a los reportados por Coakley *et al.*, quienes evaluaron fibroblastos humanos de HDFa *in vitro* de un constructo derivado de la pared de la vejiga urinaria porcina como potencial andamio en ingeniería de tejidos. El estudio encontró viabilidad de los fibroblastos dérmicos humanos. Los resultados presentaron valores de viabilidad celular superiores a 90% [Coakley 2015].

La citotoxicidad puede estar relacionada con la viabilidad celular relativa de los controles, donde valores inferiores a un 30% indican que los materiales presentan una toxicidad severa, valores entre 30 y 60% presentan una toxicidad moderada, entre 60 y 90% es leve, y valores superiores al 90% indican que los materiales no son tóxicos [Shahrousvand 2017]. Por lo tanto, luego de observar los resultados de la Figura 21 relacionados con la evaluación de la viabilidad celular de las líneas de fibroblastos, se puede deducir que los PUs no son tóxicos para ninguna de las líneas evaluadas.

3.4.3 Citotoxicidad de los subproductos de la degradación

Se realizó la evaluación de los extractos o productos de degradación de los PUs para determinar si eran tóxicos para una línea celular. Para este ensayo se utilizaron fibroblastos de ratón NIH/3T3 los cuales fueron cultivados con extractos de polímeros por un período de 30 días de incubación y por medio del ensayo MTT se determinó el porcentaje de viabilidad celular respecto del control. Los resultados de este ensayo se presentan en la Figura 22.

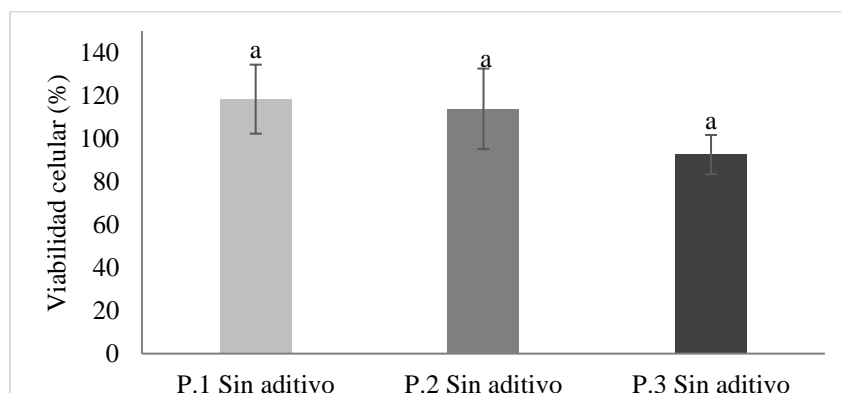


Figura 22. Porcentaje de viabilidad celular a 24 h de Fibroblastos de ratón NIH/3T3 con extractos de los PUs. Los datos están presentados como la media \pm SD (n=3). Barras con letras diferentes (a. b) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre polioles.

De acuerdo con los resultados presentados en la Figura 22 se observa que las células permanecieron viables después de su cultivo en los extractos de los PUs y, al realizar el análisis estadístico no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tipos de polioles empleados en la síntesis, indicando que todos los PUs evaluados presentan la misma tendencia y por lo tanto se puede concluir que los extractos de los materiales poliméricos no presentan efectos nocivos para los fibroblastos de ratón NIH/3T3.

Estos resultados concuerdan con los evaluados por Giannitelli *et al.*, quienes evaluaron extractos de PUs sobre cultivo celulares de fibroblastos NIH/3T3 y los resultados revelaron una excelente supervivencia (superior al 80% de viabilidad) de las células, confirmándose el carácter no citotóxico de los materiales poliméricos evaluados [Giannitelli 2015].

3.4.4 Técnicas inmunocitoquímicas

Ensayo de viabilidad celular in vitro por el kit de LIVE/DEAD. Las células L-929 cultivadas directamente sobre el PU y evaluadas con el método MTT no presentaron toxicidad. Al evaluarlas por medio del kit de viabilidad LIVE/DEAD, se pudo observar que las células quedaron adheridas al material, presentaron viabilidad y proliferaron durante el tiempo de exposición con el material. Con este kit se determina la cantidad de células vivas y muertas durante el ensayo. En este caso se determinaron las células viables y en la Figura 23 se observan las unidades de fluorescencia de los resultados de viabilidad evaluada por el kit de LIVE/DEAD.

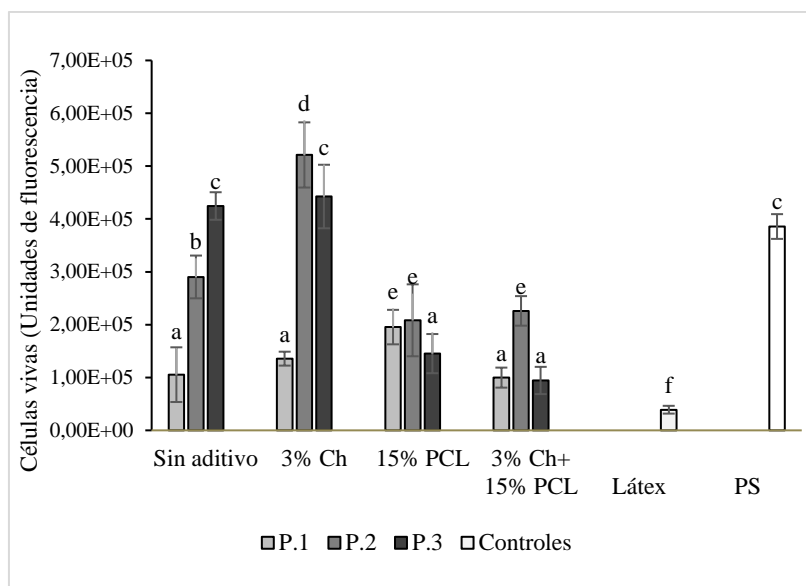


Figura 23. Unidades de fluorescencia del resultado del ensayo de viabilidad celular *in vitro* por el kit LIVE/DEAD durante 48 horas.

Control positivo Poliestireno (PS); control negativo Látex. Los datos están presentados como la media \pm SD (n=3). Barras con letras diferentes (a, b, c, d, e, f) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre polioles.

En los resultados presentados en la Figura 23 se observa que los PUs sintetizados con polioles modificados por medio de transesterificación con y sin adición de Ch presentaron valores de células vivas similares y superiores al presentado por el material empleado como control positivo, el PS. Adicionalmente, los materiales sintetizados con polioles modificados con adición de Ch presentaron diferencias estadísticas significativas con respecto a los otros PUs luego de 48 h de ensayo. De igual forma se observa que todos los materiales presentan valores superiores al control negativo empleado en el ensayo.

Todos los materiales presentan diferencias estadísticas significativas con respecto al control negativo (Látex). Al comparar los resultados del control positivo (PS), no se observan diferencias significativas con los materiales sintetizados con P.3 sin aditivo y con la adición de 3% de Ch. Esto indicaría que dichos materiales presentan un comportamiento de viabilidad celular similar al obtenido con el material de referencia del PS que es ampliamente utilizado para cultivar y proliferar células *in vitro*. De igual forma se observa que uno de los materiales evaluados presenta diferencias significativas con respecto al PS, siendo los valores de viabilidad superiores al del control positivo. Dicho PU corresponde al sintetizado con el poliol P.2 y con la adición de 3% de Ch. Con esto se podría inferir que el Ch tiene un efecto positivo ya que mejora la biocompatibilidad de los PUs.

El quitosano tiene un grupo amino primario y dos grupos hidroxilos libres por cada unidad de glucosa, lo que es beneficioso para aplicaciones biomédicas [Usman 2016]. La presencia de grupos amino libres genera un incremento de la carga positiva del polímero, por lo tanto se presenta una mayor interacción entre el Ch y las células [Aranaz 2009].

Estos resultados coinciden con los presentados por Laube *et al.*, quienes realizaron un ensayo de tinción LIVE/DEAD de fibroblastos NIH/3T3 cultivados sobre espumas de PU sintetizadas con diisocianato de lisina, y encontraron que las células eran viables y proliferaban presentando una densidad celular incrementada con el tiempo. Por lo tanto los autores proponen estos materiales como posibles sustitutos de relleno de tejidos blandos [Laube 2017].

Fijación y análisis morfológico con faloidina y DAPI. Con los resultados obtenidos con este ensayo se observó la adhesión y proliferación de las células L-929 por medio del análisis morfológico, comparado con el control negativo de látex. Como control positivo se utilizó el poliestireno (PS) que es un biomaterial empleado para el cultivo de líneas celulares. En la Figura 24 se presentan las imágenes obtenidas de las células fijadas y teñidas luego de 24 h de contacto con los PUs según el tipo de polioli.

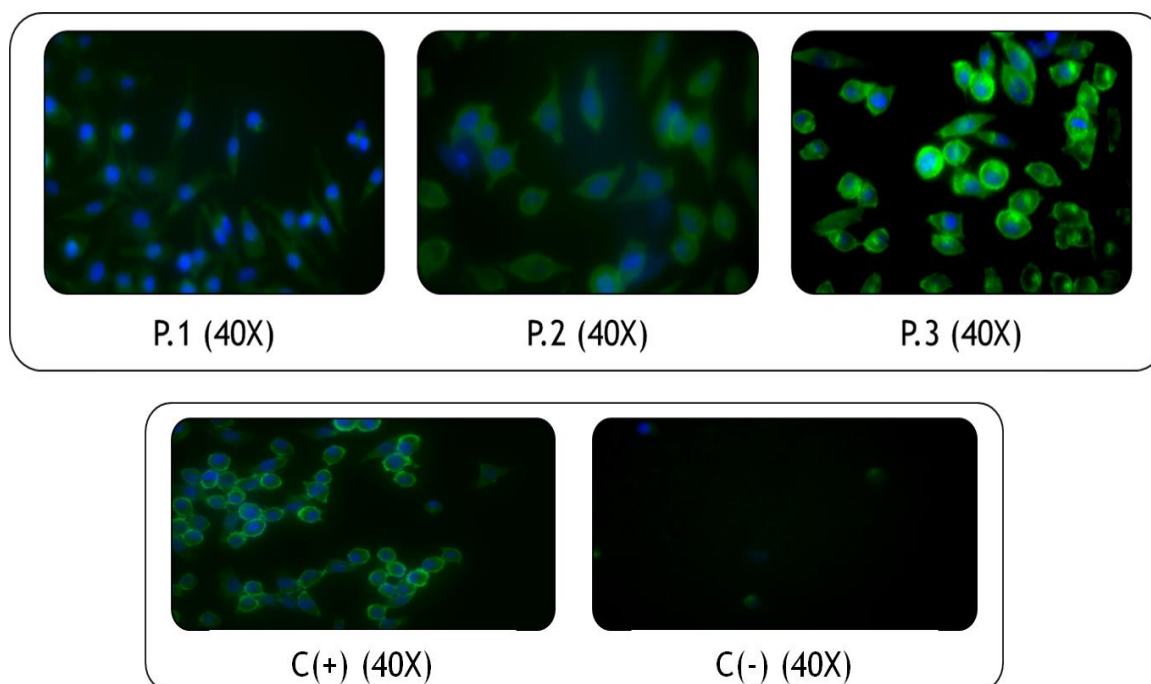


Figura 24. Imágenes de microscopía óptica de las tinciones de faloidina (verde) y DAPI (azul) para PUs representativos evaluados sobre fibroblastos L-929 durante 24 h.

C(+) control positivo de poliestireno, C(-) control negativo de látex. Imágenes analizadas por medio del software ImageJ.

Este tipo de técnicas permite realizar una tinción de las fibras de la F-actina, un componente principal del citoesqueleto, por medio de la faloidina generando una coloración verde [Ortuno-Lizarán 2016]; y una tinción de los núcleos de los fibroblastos por medio de la coloración azul generada por la tinción DAPI. Según se observa en las imágenes, la estructura de la línea celular de los fibroblastos L-929 se conserva al compararla con el control positivo. De igual forma, el tipo de polirol o aditivo no genera cambios conformacionales de la estructura celular. Según se aprecia en las imágenes, las células de los fibroblastos pudieron adherirse al material polimérico evaluado luego de 24 h de contacto. La morfología celular puede indicar interacciones sustrato-célula. Las formas celulares planas y extendidas indican una fuerte adhesión de célula a sustrato, mientras que una morfología redondeada generalmente significa que las células tienen dificultades para unirse al sustrato [Jing 2016].

Con lo anterior se puede inferir que los PUs evaluados en contacto directo con las células permiten la proliferación celular y no afecta la morfología celular luego de 24 h de ensayo. Por lo tanto, los PUs sintetizados en esta investigación pueden ser aptos como materiales para el diseño de suturas no-absorbibles.

3.4.5 Ensayo *in vitro* de actividad antibacteriana

Como parte de la evaluación de la bicompatibilidad de los PUs, se determinó la actividad antibacteriana de las muestras de polímero frente a cepas bacterianas. Un material con actividad bacteriana puede disminuir la colonización bacteriana y prevenir infecciones por lo que la protección antibacteriana es un factor fundamental cuando se diseñan biomateriales. Por tal motivo se determinó la actividad antibacteriana de los PUs contra bacterias Gram negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*) y una bacteria Gram positiva (*S. aureus*) por medio del conteo de las unidades formadoras de colonia luego de 24 h de exposición de los polímeros con cada bacteria. En la Figura 26 se presentan los resultados de la actividad antibacteriana que presentan los PUs contra *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, respectivamente.

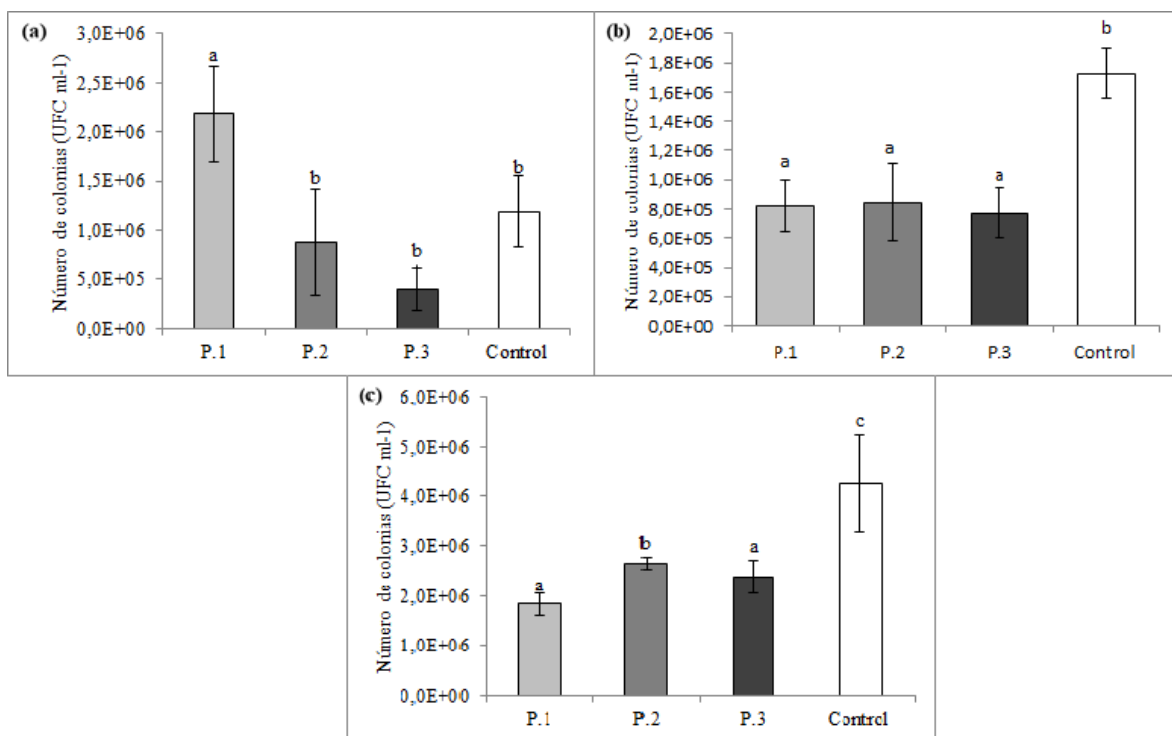


Figura 25. Porcentaje de inhibición bacteriana de los PUs con diferentes bacterias. Suspensión bacteriana sin polímero corresponde al Control. (a) Actividad antimicrobiana contra *E. coli*, (b) Actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, (c) Actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa*. Las unidades formadoras de colonia por mililitro de muestra original (UFC mL⁻¹) están dadas como medias \pm S.D. (n=3). Barras con letras diferentes (a, b, c) indican diferencias significativas (p<0,05) entre polioles.

Al realizar un análisis estadístico del análisis de varianza para los resultados de la Figura 26(a) se observa que para *E. coli* existen diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) entre los polioles P.1 con P.2 y P.3 y adicional se observa que el control es diferente significativamente con el poliol P.3 indicando que el poliol P.3 tiene el porcentaje de inhibición más alto para *E. coli* bajo las condiciones del ensayo. En cuanto a los resultados relacionados con *S. aureus*, según se observa en la Figura 26(b), no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de polioles, pero sí existen diferencias estadísticas entre los 3 tipos de polioles con el control, por lo que se puede inferir que PUs sintetizados con cada uno de los polioles derivados del aceite de higuera inhiben a *S. aureus*. Para el último ensayo de inhibición bacteriana relacionada con *P. aeruginosa* (Figura 26(c)) se observó que no existen diferencias entre los tipos de polioles, pero sí existen diferencias estadísticas entre los 3 polioles con el control. De acuerdo con los resultados observados se puede concluir que los poliuretanos evaluados en este estudio presentan inhibición bacteriana contra *P. aeruginosa*.

Con los resultados anteriores se observó que los materiales poliméricos evaluados presentaron actividad antimicrobiana. La superficie altamente hidrofóbica (cerca a los 100° de ángulo de contacto) de los materiales no permite la adhesión de las bacterias. El aumento del índice hidroxilo en los polioles mejora los resultados de inhibición bacteriana. Esto coincide con un estudio realizado por Kara *et al.* (2015), quienes evaluaron *S. aureus* y *S. epidermidis* (Gram positivas) y *E. coli* y *P. aeruginosa* (Gram negativas) sobre PUs sintetizados con diisocianato de hexametileno y con adición de quitosano y heparina para generar incremento en la actividad antibacteriana. Ellos reportaron actividad antibacteriana comparada con el blanco de todas las bacterias evaluadas y atribuyen esto a la presencia de grupos polares que pueden quelar fácilmente o interactuar con algunos cationes que desempeñan un papel clave para el metabolismo de las bacterias, o pueden perturbar el puente de hidrógeno estable en el entorno de las bacterias, o pueden unirse directamente a los organismos y provocar su muerte [Kara 2015]. En un estudio previo Tijjing *et al.* (2012) evaluaron la actividad antimicrobiana de PUs con nanopartículas de plata y óxido de polietileno contra la bacteria Gram negativa de *E. coli* por medio de inhibición en placa y encontraron zonas de inhibición atribuidas a la presencia de las nanopartículas de plata que tienen efecto antibacterial [Tijjing 2012]. De esta forma se puede decir que son diversos los factores de los materiales que influyen en el crecimiento microbiano, como la hidrofobicidad de la superficie, la rugosidad, la química del material, entre otros [Clauss 2010].

3.5 CONCLUSIONES

Los PUs sintetizados con polioles derivados del aceite de higuera, diisocianato de isoforona, policaprolactona (15% p/p) y quitosano (3% p/p) se utilizaron para evaluar propiedades de biodegradabilidad y biocompatibilidad como el porcentaje de degradación *in vitro* en medio ácido y básico, y la degradación enzimática por medio de una esterasa de hígado de cerdo. Se observó que los porcentajes de degradación bajo las condiciones de evaluación presentaron valores inferiores a 4% por lo que se puede inferir que el entrecruzamiento de los PUs sintetizados dificulta el proceso de degradación. Se determinó la viabilidad celular *in vitro* usando fibroblastos de ratón L-929, fibroblastos humanos MRC-5 y fibroblasto dérmico humano HDFa. Los resultados sobre viabilidad celular de los PUs sobre las tres líneas celulares mostraron que los PUs evaluados presentan viabilidad celular

sobre fibroblastos con lo que se podría esperar que dichos materiales puedan ser empleados para contacto directo con la piel sin generar daño a las células circundantes. También se determinó la viabilidad mediante el kit de LIVE/DEAD sobre fibroblastos de ratón L-929. Se evaluó la actividad antimicrobiana de los PUs sobre *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Todos los materiales poliméricos evaluados presentaron inhibición bacteriana contra *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* comparados con los controles. Adicional a esto, se observó que los extractos de los polímeros no fueron tóxicos para células de fibroblastos NIH/3T3. Por las propiedades biocompatibles de los PUs evaluadas en este capítulo se puede inferir que son idóneos para ser utilizados en aplicaciones biomédicas como materiales para suturas biomédicas no absorbibles.

3.6 BIBLIOGRAFÍA

- Adolph, E. J., Pollins, A. C., Cardwell, N. L., Davidson, J. M., Guelcher, S. A., & Nanney, L. B. (2014). Biodegradable lysine-derived polyurethane scaffolds promote healing in a porcine full-thickness excisional wound model. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 25(17), 1973–85.
- Alishiri, M., Shojaei, A., Abdekhodaie, M. J., & Yeganeh, H. (2014). Synthesis and characterization of biodegradable acrylated polyurethane based on poly(ϵ -caprolactone) and 1,6-hexamethylene diisocyanate. *Materials Science and Engineering C*, 42, 763–73.
- Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Heras, Á. (2009). Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biol.*, 3, 203–230.
- Bakhshi, H., Yeganeh, H., Yari, A., & Nezhad, S. K. (2014). Castor oil-based polyurethane coatings containing benzyl triethanol ammonium chloride: synthesis, characterization, and biological properties. *Journal of Materials Science*, 49(15), 5365–5377.
- Basak, P., & Adhikari, B. (2012). Effect of the solubility of antibiotics on their release from degradable polyurethane. *Materials Science and Engineering C*, 32(8), 2316–2322.
- Calvo-Correas, T., Santamaria-Echart, A., Saralegi, A., Martin, L., Valea, Á., Corcuera, M. A., & Eceiza, A. (2015). Thermally-responsive biopolyurethanes from a biobased diisocyanate. *European Polymer Journal*, 70, 173–185.
- Chen, R., Zhang, C., & Kessler, M. R. (2014). Polyols and polyurethanes prepared from epoxidized soybean oil ring-opened by polyhydroxy fatty acids with varying oh numbers.

- Journal of Applied Polymer Science*, 132(1), 1–10.
- Cherng, J. Y., Hou, T. Y., Shih, M. F., Talsma, H., & Hennink, W. E. (2013). Polyurethane-based drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 450, 145–62.
- Clauss, M., Trampuz, A., Borens, O., Bohner, M., & Ilchmann, T. (2010). Biofilm formation on bone grafts and bone graft substitutes: Comparison of different materials by a standard in vitro test and microcalorimetry. *Acta Biomaterialia*, 6(9), 3791–3797.
- Coakley, D. N., Shaikh, F. M., O’Sullivan, K., Kavanagh, E. G., Grace, P. A., & McGloughlin, T. M. (2015). In vitro evaluation of acellular porcine urinary bladder extracellular matrix - A potential scaffold in tissue engineered skin. *Wound Medicine*, 10–11, 9–16.
- Conejero-García, Á., Gimeno, H. R., Sáez, Y. M., Vilariño-Feltre, G., Ortuño-Lizarán, I., & Vallés-Lluch, A. (2017). Correlating synthesis parameters with physicochemical properties of poly(glycerol sebacate). *European Polymer Journal*, 87, 406–419.
- Das, B., Konwar, U., Mandal, M., & Karak, N. (2013). Sunflower oil based biodegradable hyperbranched polyurethane as a thin film material. *Industrial Crops and Products*, 44, 396–404.
- Estrada, A., & Herrera, J. (2013). Síntesis de materiales a base de uretano reforzados con nanopartículas metálicas. I. Síntesis y caracterización. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 14(1), 28–38. Retrieved from
- Giannitelli, S. M., Basoli, F., Mozetic, P., Piva, P., Bartuli, F. N., Luciani, F., ... Licoccia, S. (2015). Graded porous polyurethane foam: a potential scaffold for oro-maxillary bone regeneration. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 51, 329–35.
- Gogoi, S., Barua, S., & Karak, N. (2014). Biodegradable and thermostable synthetic hyperbranched poly(urethane-urea)s as advanced surface coating materials. *Progress in Organic Coatings*, 77(9), 1418–1427.
- Guan, J., Sacks, M. S., Beckman, E. J., & Wagner, W. R. (2004). Biodegradable poly(ether ester urethane)urea elastomers based on poly(ether ester) triblock copolymers and putrescine: synthesis, characterization and cytocompatibility. *Biomaterials*, 25(1), 85–96.
- Han, W., Tu, M., Zeng, R., Zhao, J., & Zhou, C. (2012). Preparation, characterization and cytocompatibility of polyurethane/cellulose based liquid crystal composite membranes.

- Carbohydrate Polymers*, 90(3), 1353–1361.
- Jing, X., Mi, H. Y., Huang, H. X., & Turng, L. S. (2016). Shape memory thermoplastic polyurethane (TPU)/poly(ϵ -caprolactone) (PCL) blends as self-knotting sutures. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 64, 94–103.
- Kara, F., Aksoy, E. A., Yuksekdog, Z., Aksoy, S., & Hasirci, N. (2015). Enhancement of antibacterial properties of polyurethanes by chitosan and heparin immobilization. *Applied Surface Science*, 357, 1692–1702.
- Kucinska-Lipka, J., Gubanska, I., Janik, H., & Sienkiewicz, M. (2015). Fabrication of polyurethane and polyurethane based composite fibres by the electrospinning technique for soft tissue engineering of cardiovascular system. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 46, 166–76.
- Larrazza, Í. (2012). *Desarrollo de nuevas estrategias para la preparación de nanocomposites con propiedades antimicrobianas*. Universidad Autónoma de Madrid.
- Laube, T., Weisser, J., Berger, S., Börner, S., Bischoff, S., Schubert, H., ... Schnabelrauch, M. (2017). In situ foamable, degradable polyurethane as biomaterial for soft tissue repair. *Materials Science and Engineering C*, 78, 163–174.
- Li, Y., & Shimizu, H. (2007). Toughening of polylactide by melt blending with a biodegradable poly (ether) urethane elastomer. *Macromolecular Bioscience*, 7, 921–928.
- McBane, J. E., Sharifpoor, S., Cai, K., Labow, R. S., & Santerre, J. P. (2011). Biodegradation and in vivo biocompatibility of a degradable, polar/hydrophobic/ionic polyurethane for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 32(26), 6034–44.
- Ortuno-Lizarán, I., Vilarino-Feltrer, G., Martinez-Ramos, C., Pradas, M. M., & Vallés-Lluch, A. (2016). Influence of synthesis parameters on hyaluronic acid hydrogels intended as nerve conduits. *Biofabrication*, 8(4), 1–12.
- Park, H., Gong, M.-S., Park, J.-H., Moon, S.-I., Wall, I. B., Kim, H.-W., ... Knowles, J. C. (2013). Silk fibroin-polyurethane blends: physical properties and effect of silk fibroin content on viscoelasticity, biocompatibility and myoblast differentiation. *Acta Biomaterialia*, 9(11), 8962–71.
- Rajan, K. P., Al-ghamdi, A., Parameswar, R., & Nando, G. B. (2013). Blends of Thermoplastic Polyurethane and Polydimethylsiloxane Rubber: Assessment of Biocompatibility and Suture Holding Strength of Membranes. *International Journal of*

Biomaterials, 1–7.

- Reddy, T. T., Kano, A., Maruyama, A., & Takahara, A. (2010). Synthesis, characterization and drug release of biocompatible/biodegradable non-toxic poly(urethane urea)s based on poly(epsilon-caprolactone)s and lysine-based diisocyanate. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 21(November 2014), 1483–1502.
- Rezvanain, M., Ahmad, N., Mohd Amin, M. C. I., & Ng, S. F. (2017). Optimization, characterization, and in vitro assessment of alginate-pectin ionic cross-linked hydrogel film for wound dressing applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 131–140.
- Rocco, K. a, Maxfield, M. W., Best, C. a, Dean, E. W., & Breuer, C. K. (2014). In vivo applications of electrospun tissue-engineered vascular grafts: a review. *Tissue Engineering. Part B*, 20(6), 628–640.
- Rodríguez-Galán, A., Franco, L., & Puiggal, J. (2011). Biodegradable polyurethanes and poly(ester amide)s. In A. Lendlein & A. Sisson (Eds.), *Handbook of Biodegradable Polymers: Synthesis, Characterization and Applications* (First, pp. 133–154).
- Rodríguez, A., & Rodríguez, Y. (2015). *Biodegradación depoliuretao mediante el uso del hongo Pestalotiopsis microspora*. Barrancabermeja, Santander-Colombia.
- Shahrousvand, M., Sadeghi, G. M. M., Shahrousvand, E., Ghollasi, M., & Salimi, A. (2017). Superficial physicochemical properties of polyurethane biomaterials as osteogenic regulators in human mesenchymal stem cells fates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 156, 292–304.
- Spontón, M., Casis, N., Mazo, P., Raud, B., Simonetta, A., Ríos, L., & Estenoz, D. (2013). Biodegradation study by Pseudomonas sp . of flexible polyurethane foams derived from castor oil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 85–94.
- St John, K. R. (2014). The use of compliant layer prosthetic components in orthopedic joint repair and replacement: a review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 102(6), 1332–41.
- Thakur, S., & Karak, N. (2013). Castor oil-based hyperbranched polyurethanes as advanced surface coating materials. *Progress in Organic Coatings*, 76(1), 157–164.
- Tijing, L. D., Ruelo, M. T. G., Amarjargal, A., Pant, H. R., Park, C. H., & Kim, C. S. (2012). One-step fabrication of antibacterial (silver nanoparticles/poly(ethylene oxide)) -

- Polyurethane bicomponent hybrid nanofibrous mat by dual-spinneret electrospinning. *Materials Chemistry and Physics*, 134(2–3), 557–561.
- Tsai, M.-C., Hung, K.-C., Hung, S.-C., & Hsu, S. (2015). Evaluation of biodegradable elastic scaffolds made of anionic polyurethane for cartilage tissue engineering. *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces*, 125, 34–44.
- Usman, A., Zia, K. M., Zuber, M., Tabasum, S., Rehman, S., & Zia, F. (2016). Chitin and chitosan based polyurethanes: a review of recent advances and prospective biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 630–645.
- van Minnen, B., Stegenga, B., van Leeuwen, M. B. M., van Kooten, T. G., & Bos, R. R. M. (2006). A long-term in vitro biocompatibility study of a biodegradable polyurethane and its degradation products. *Journal of Biomed. Materials Research. Part A*, 76(2), 377–85.
- Vannozzi, L., Ricotti, L., Santaniello, T., Terencio, T., Oropesa-Nunez, R., Canale, C., ... Gerges, I. (2017). 3D porous polyurethanes featured by different mechanical properties: Characterization and interaction with skeletal muscle cells. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 75(July), 147–159.
- Vilariño Feltrer, G., Martínez Ramos, C., Monleon De La Fuente, A., Vallés Lluch, A., Moratal Pérez, D., Barcia Albacar, J., & Monleón Pradas, M. (2016). Schwann-cell cylinders grown inside hyaluronic-acid tubular scaffolds with gradient porosity. *Acta Biomaterialia*, 30, 199–211.
- Wang, W., Guo, Y., & Otaigbe, J. (2008). Synthesis and characterization of novel biodegradable and biocompatible poly (ester-urethane) thin films prepared by homogeneous solution polymerization. *Polymer*, 49, 4393–4398.
- Wang, Y., Yu, Y., Zhang, L., Qin, P., & Wang, P. (2015). One-step surface modification of polyurethane using affinity binding peptides for enhanced fouling resistance. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 26(8), 459–467.
- Wu, C.-S. (2016). Enhanced antibacterial activity, antioxidant and in vitro biocompatibility of modified polycaprolactone-based membranes. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 65(17), 872–880.
- Zhou, L., Liang, D., He, X., Li, J., Tan, H., Li, J., ... Gu, Q. (2012). The degradation and biocompatibility of pH-sensitive biodegradable polyurethanes for intracellular multifunctional antitumor drug delivery. *Biomaterials*, 33(9), 2734–2745.

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL POSIBLE EFECTO INFLAMATORIO DE MATERIALES BASADOS EN POLIURETANOS PARA SUTURAS NO ABSORBIBLES

4.1 RESUMEN

El objetivo de este capítulo fue evaluar la respuesta inmune relacionada con la inflamación de macrófagos derivados de la línea celular THP-1 en contacto con PUs sintetizados con polioles derivados del aceite de higuera (*Ricinus communis*) con diisocianato de isoforona (IPDI), policaprolactona (PCL) (15% p/p) y quitosano (Ch) (3% p/p). Se evaluó la respuesta inflamatoria por medio de la expresión de citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-5, IL-10) y proinflamatorias (IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α) expresadas en un modelo celular como son las células THP-1 con y sin estímulo de lipopolisacárido (LPS) por medio del kit MILLIPLEX[®] MAP. Células transformadas a macrófagos por medio de Forbol-12-Miristato-13-Acetato (PMA) fueron ensayadas con los PUs para determinar si el material desencadenaba procesos inflamatorios en las células. Células estimuladas con LPS se pusieron en contacto con PUs para evaluar la posible actividad antiinflamatoria de los materiales. De acuerdo con los resultados, los PUs no generaron inflamación, e igualmente no presentaron actividad antiinflamatoria. Los PUs pueden ser candidatos como materiales para suturas biomédicas por presentar expresión de citoquinas comparables con un material homólogo como son las suturas no absorbibles de polipropileno.

4.2 INTRODUCCIÓN

Los monocitos y macrófagos hacen parte del sistema inmune innato debido a que son células que están involucradas en procesos inflamatorios con la capacidad de sintetizar y secretar citoquinas pro y antiinflamatorias [Chanput 2010]. Las citoquinas corresponden a un grupo diverso de proteínas extracelulares, hidrosolubles, que influyen en la producción y actividad de otras citoquinas aumentando (proinflamatorias) o disminuyendo (antiinflamatorias) la respuesta inflamatoria [Oliveira 2011].

La línea celular monocitaria humana THP-1 es ampliamente utilizada en investigación gracias a la capacidad de diferenciación de monocitos a macrófagos [Small 2018]. Los monocitos de THP-1 tienen una forma redonda cuando están en suspensión y cuando se diferencian con Forbol-12-Miristato-13-Acetato (PMA) las células comienzan a adherirse a las placas de cultivo y adquieren características fenotípicas y funcionales similares a las de los macrófagos humanos primarios [Lund 2016, Ballerini 2017]. La evaluación de la respuesta inmune se determina midiendo la presencia de citoquinas en el medio de cultivo de las células [Chanput 2010].

Las respuestas inflamatorias de macrófagos se activan ante la presencia de patógenos invasores, partículas, lipopolisacáridos (LPS), y otros estímulos [Dreskin 2001]. El LPS hace parte de la membrana externa de bacterias Gram negativas y puede causar daño tisular y liberación de múltiples citoquinas proinflamatorias [Dreskin 2001]. Por lo tanto, cuando se induce una respuesta inflamatoria se pueden liberar citoquinas proinflamatorias como la interleucina-1 beta (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-6 (IL-6). De igual forma se pueden liberar citoquinas antiinflamatorias como la interleucina-10 (IL-10) [Dash 2015]. Biomateriales como el polietileno de alto peso molecular pueden activar macrófagos y secretar citoquinas proinflamatorias como la TNF- α , la IL-1 β , entre otras, como respuesta del implante del material [Lin 2014].

El objetivo de este capítulo consistió en establecer el efecto que presentaban los materiales para suturas no absorbibles obtenidas sobre la respuesta en procesos inflamatorios *in vitro* en comparación con un material homólogo comercial como el polipropileno (PP). Se evaluó la respuesta antiinflamatoria y proinflamatoria por medio de la expresión de citoquinas (IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- α) expresadas por las células THP-1 con y sin estímulo con LPS. Las células fueron expuestas sobre PUs sintetizados con aceite de higuera y diisocianato de isoforona (IPDI), con la adición de policaprolactona (PCL) (15% p/p) y quitosano (Ch) (3% p/p). El presente ensayo sirve como un screening de efectos inmuno-moduladores de materiales tipo PUs sintetizados con aceite de higuera.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1 Reactivos y línea celular

Forbol-12-Miristato-13-Acetato (PMA) fue adquirido con Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Buffer fosfato salino (PBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), MTT (Bromuro de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazolio), tripsina 2,5% (10X), Penicilin-Streptomycin (10.000 Und de penicilina y 10.000 µg de estreptomicina por mililitro), RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), lipopolisacárido (LPS) (*Escherichia coli* 026:B6) fueron marca Gibco/Invitrogen, Paisley, UK. Suero fetal bovino (FBS) marca Eurobio (Les Ulis, France). La línea celular monocitaria de leucemia aguda humana, THP-1 (ATCC® TIB-202™) fue adquirida de la biblioteca de cepas de la Universidad de La Sabana (Colombia).

4.3.2 Diferenciación a macrófagos y estimulación de inflamación

Se utilizó una línea celular monocitaria de leucemia aguda humana, THP-1. Las células se cultivaron a 37 °C, 5% CO₂ en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (10%) y penicilina-streptomycin (1%) en frascos de cultivo celular T75. Para la diferenciación celular a macrófagos, las células fueron centrifugadas a 2000 rpm por 10 min, re-suspendidas en 3 ml de medio de cultivo RPMI y sembradas en placas de 24 pocillos [Park 2007] con adición de 200 mM de PMA por 48 h [Dreskin 2001]. Las células diferenciadas (macrófagos) fueron lavadas dos veces con PBS para remover células no diferenciadas [Ballerini 2017]. Los macrófagos diferenciados con PMA fueron estimulados con 700 ng ml⁻¹ de LPS durante un período de 3 h [Chanput 2010].

4.3.3 Evaluación de procesos inflamatorios

Con la línea celular de THP-1 y con los PUs se realizaron dos ensayos independientes para evaluar los procesos inflamatorios de los materiales en contacto con las células. El primer ensayo, denominado ensayo A, consistió en el contacto directo de los PUs sobre las células diferenciadas a macrófagos con PMA, durante un período de 24 h, con el fin de determinar si los PUs generaban inflamación luego del contacto con la línea celular. El siguiente grupo de ensayo (ensayo B) estaba formado por PUs en contacto durante 24 h con

macrófagos diferenciados con PMA y estimulados con LPS, para determinar si los materiales presentaban actividad antiinflamatoria.

4.3.4 Inmunoensayo

Por medio del kit MILLIPLEX® MAP para citometría de flujo se evaluó la producción de las citoquinas (IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- α) y liberación al sobrenadante de los macrófagos cultivados en contacto con los PUs durante 24 h, siguiendo las instrucciones dadas por los fabricantes. Una mezcla de perlas con diferentes intensidades de fluorescencia, cubiertas con anticuerpos para las citoquinas mencionadas, se preincubaron en la oscuridad por una hora en un agitador orbital. La concentración de los estándares fue de 3,2, 16, 80, 400, 2000 y 10000 pg ml⁻¹ para determinar la curva de concentración de cada analito. En una placa de 96 pocillos se adicionaron 200 μ l de buffer de lavado, se agitó por 10 min y se descartó el sobrenadante. Se adicionaron 25 μ l de los estándares, 25 μ l de buffer de corrida, 25 μ l de solución matriz, 25 μ l de sobrenadante de las células en los pocillos adecuados, y 25 μ l de la mezcla de las perlas. El plato fue incubado *overnight* con agitación a 4 °C. El sobrenadante fue removido y se hicieron dos lavados con 200 μ l de buffer de lavado, se adicionaron 25 μ l de anticuerpos para la detección y se incubó por 1 hora en la oscuridad y con agitación. Se adicionaron 25 μ l de la proteína de unión Estreptavidina ficoeritrina, se incubó durante 30 min con agitación y en la oscuridad. Se descartó el sobrenadante y se lavaron los pozos dos veces con 200 μ l de buffer de lavado. Se adicionaron 150 μ l de líquido de revestimiento y se realizó la lectura del plato en un citómetro de flujo MAGPIX de MILLIPLEX MAP. Los resultados de las muestras fueron analizados utilizando el software xPONENT MAGPIX.

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Doce materiales sintetizados con polioles derivados del aceite de higuera e IPDI con 3% de Ch y 15% de PCL fueron evaluados para determinar los procesos de inflamación *in vitro* generados luego del contacto de los materiales sobre una línea celular. La inflamación se evaluó por medio de la liberación de diferentes citoquinas al medio de células THP-1, diferenciadas a macrófagos, con y sin estimulación de LPS y en contacto con los PUs. Se analizaron nueve marcadores inflamatorios compuestos por citoquinas proinflamatorias y

antiinflamatorias (IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- α). El primer grupo de ensayo (Grupo A) consistió en determinar el posible efecto de los PUs sobre el proceso inflamatorio de los macrófagos. En la Figura 27 se observan las concentraciones de las citoquinas antiinflamatorias expresadas luego de las 24 h de exposición de los PUs con los macrófagos. En la Figura 28 se presenta la concentración de citoquinas proinflamatorias expresadas en el medio de cultivo. Como material de referencia se utilizó un biomaterial de polipropileno (PP) empleado como suturas biomédicas no absorbibles. Como control se empleó el medio de cultivo sin polímero y en las Figuras 27 y 28 se presenta la expresión de citoquinas en los monocitos, las células que no fueron tratadas con PMA.

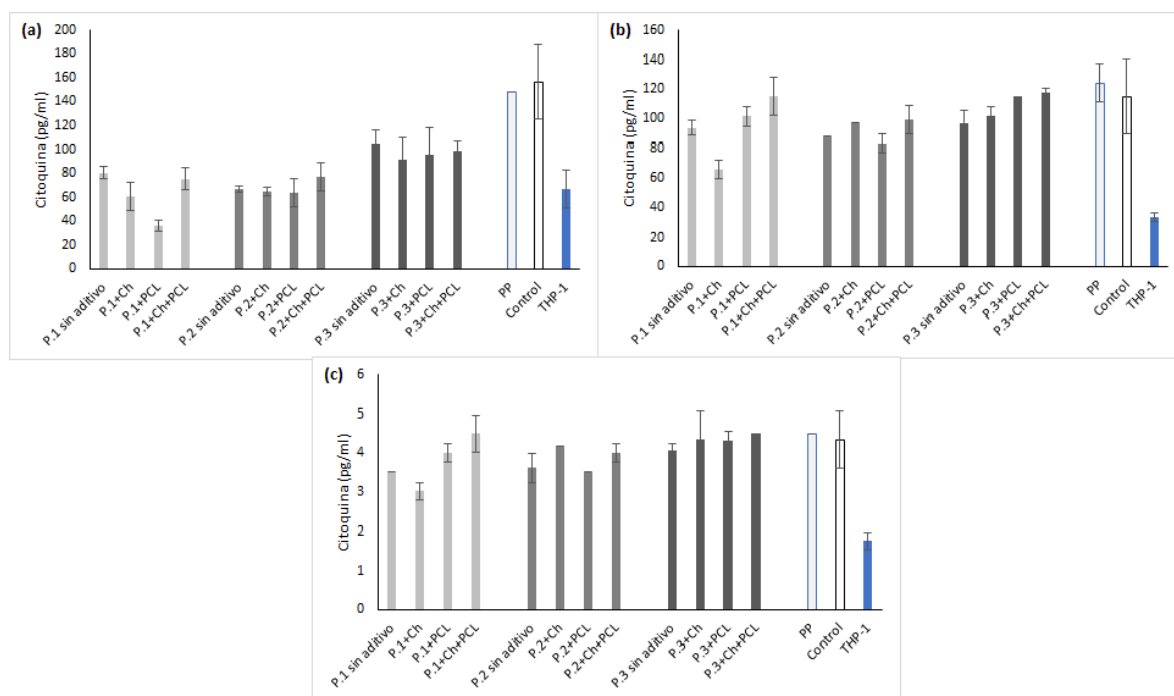


Figura 26. Citoquinas antiinflamatorias sin estimulación de LPS.

(a) IL-10; (b) IL-5; (c) IL-4. PP: polipropileno como material de referencia; Control: medio de cultivo sin PUs; THP-1: monocitos de la línea celular. La concentración de citoquinas está dada como medias \pm S.D. (n=3).

El segundo grupo de ensayo (grupo B) fue desarrollado con el objetivo de determinar si los materiales sintetizados presentaban actividad antiinflamatoria sobre células a las cuales se les había estimulado inflamación por medio de LPS previo al contacto directo con los PUs. Los resultados de la concentración de citoquinas antiinflamatorias y proinflamatorias del ensayo B se presentan en las Figuras 29 y 30, respectivamente. Se ensayó el PP como material de referencia y se utilizó medio de cultivo sin polímero como control.

Según se observa en los resultados de los grupos A y B no se presentaron diferencias significativas entre las concentraciones de las citoquinas expresadas por las células estimuladas con LPS y las no estimuladas. Esto puede estar relacionado con el protocolo utilizado. Aún no se cuenta con un protocolo estandarizado para realizar la diferenciación de los monocitos de THP-1 a macrófagos con PMA. Es así como se encuentra una amplia variación de las concentraciones de PMA, entre 6 y 600 nM, el tiempo de estimulación con PMA puede variar de 3 a 72 h, y los períodos de recuperación pueden estar entre 0 y 10 días [Lund 2016, Starr 2018]. Es probable que concentraciones altas de PMA, superiores a 100 ng ml⁻¹, incrementen los niveles de expresión de genes asociados con inflamación y un incremento en la secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF o IL-8 [Lund 2016].

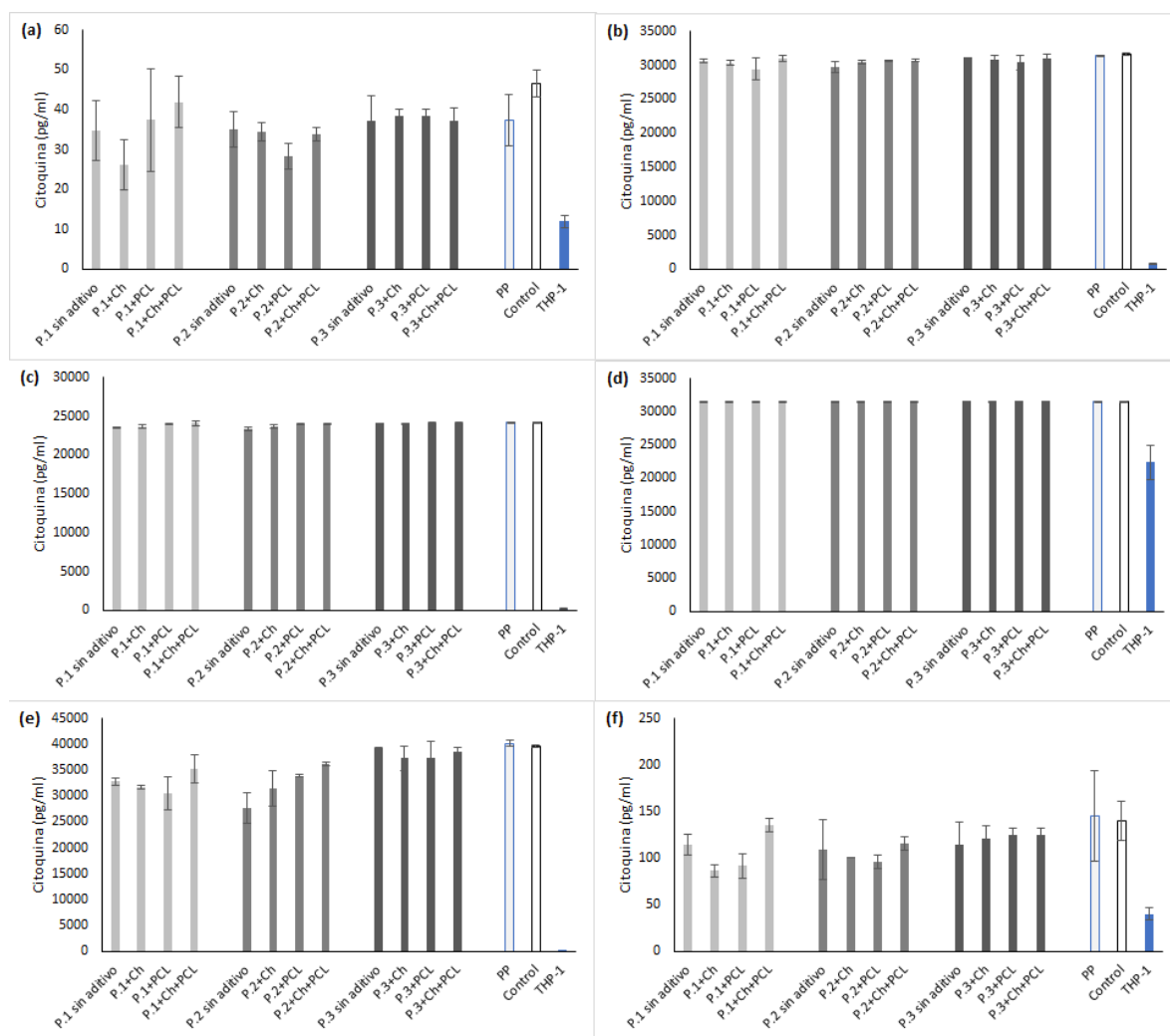


Figura 27. Citoquinas proinflamatorias sin estimulación de LPS.

(a) INF-γ; (b) TNF-α; (c) IL-1β; (d) IL-8; (e) IL-6; (f) IL-2. PP: polipropileno como material de referencia; Control: medio de cultivo sin PUs; THP-1: monocitos de la línea celular. La concentración de citoquinas está dada como medias ±S.D. (n=3).

Según lo expuesto por Park *et al.* (2007) concentraciones elevadas de PMA puede expresar algunos genes durante el proceso de diferenciación, lo que a su vez puede enmascarar el efecto de los estímulos posteriores a la diferenciación [Park 2007]. Con lo anterior se puede inferir que durante el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos de las células THP-1 se utilizaron concentraciones de PMA que desencadenaron la liberación de citoquinas pro y antiinflamatorias antes de exponer las células a un estímulo inflamatorio por medio del LPS.

Con los resultados obtenidos para el grupo A (Figuras 27 y 28) se puede observar que los PUs evaluados no generan un proceso inflamatorio a los macrófagos de la línea celular THP-1. Lo anterior se afirma con base en los resultados que presentaron el control (medio sin PU) y el material de referencia PP, los cuales presentaron valores superiores, aunque en algunos casos no significativos, en las concentraciones de las citoquinas evaluadas tanto antiinflamatorias como proinflamatorias.

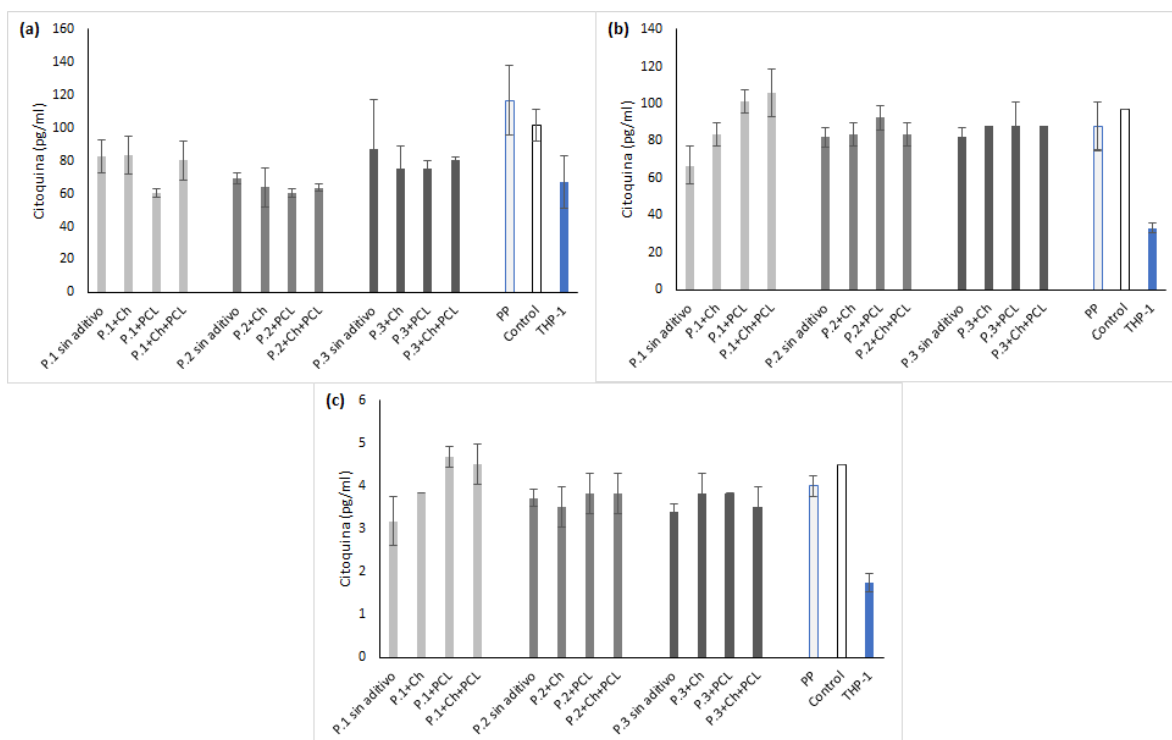


Figura 28. Citoquinas antiinflamatorias con estimulación de LPS.

(a) IL-10; (b) IL-5; (c) IL-4. PP: polipropileno como material de referencia; Control: medio de cultivo sin PUs; THP-1: monocitos de la línea celular. La concentración de citoquinas está dada como medias \pm S.D. (n=3).

Una inflamación aguda en un organismo se presenta debido a una respuesta de protección del organismo frente a daños tisulares producidos por agentes infecciosos o extraños al organismo. Las primeras citoquinas formadas ante la respuesta a lipopolisacáridos bacterianos, frente a una lesión tisular o una infección son TNF- α y la IL-1 β actuando directamente sobre receptores específicos y desencadenando una cascada de otros efectores como citoquinas, quimiocinas, entre otros [Oliveira 2011, Lund 2016, Gómez Estrada 2011]. La TNF- α y la IL-1 β tienen un efecto sinérgico sobre la inflamación que también es promovida por el IFN- γ a través del aumento de la TNF- α [Gómez Estrada 2011]. El factor de necrosis tumoral (TNF- α) es una citoquina proinflamatoria que se estimula de manera precoz ante una respuesta inflamatoria [Oliveira 2011].

Entre las citoquinas evaluadas se tenía la interleucina-4 (IL-4) que se caracteriza por poseer actividad antiinflamatoria potente y puede inhibir la síntesis de citoquinas proinflamatorias [González 2009]. Actúa sobre los macrófagos activados para reducir los efectos de las citoquinas IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-8 [Oliveira 2011]. Por lo tanto, se observa que al expresarse una citoquina antiinflamatoria o proinflamatoria se inhibe la expresión de su antítesis. En el caso de la IL-4 de la Figura 29(c) presentó valores cercanos a 5 pg ml⁻¹ y su antítesis como la TNF- α , IL-6 e IL-8 presentaron valores superiores a 20000 pg ml⁻¹ según se observa en la Figura 27. También se evaluó la interleucina-10 (IL-10) que ejerce acciones antiinflamatorias sobre monocitos o macrófagos [González 2009]. Inhibe las citoquinas proinflamatorias IL-1, TNF- α , IL-6, estimulando la producción endógena de citoquinas antiinflamatorias [Oliveira 2011].

El factor de necrosis tumoral (TNF- α) juega un papel importante en la respuesta inflamatoria de un organismo, como ya se mencionó. Bajo la estimulación con LPS se presenta un estado inflamatorio sistémico caracterizado por los niveles incrementados de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , la IL-1 β y por la disminución de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 [Ballerini 2017]. Este comportamiento se pudo observar en los valores obtenidos del grupo B ya que en la Figura 30(a) los valores obtenidos para la TNF- α presentaban concentraciones cercanas a 30000 pg ml⁻¹ y la IL-1 β presentó valores de 25000 pg ml⁻¹, pero para la IL-10 se encontraron valores promedios de 80 pg ml⁻¹.

Otras citoquinas evaluadas fueron las interleucinas 2 y 6. La interleucina-2 (IL-2) es una citoquina proinflamatoria que se caracteriza por la generación y propagación de la respuesta

inmunológica específica del antígeno [Oliveira 2011]. La interleucina-6 (IL-6) es una citoquina con propiedades proinflamatorias y niveles elevados están asociados con la severidad en los procesos sépticos. En algunos casos se considera que la IL-6 es una citoquina antiinflamatoria, ya que puede inducir proteínas beneficiosas en los procesos de choque séptico [González 2009].

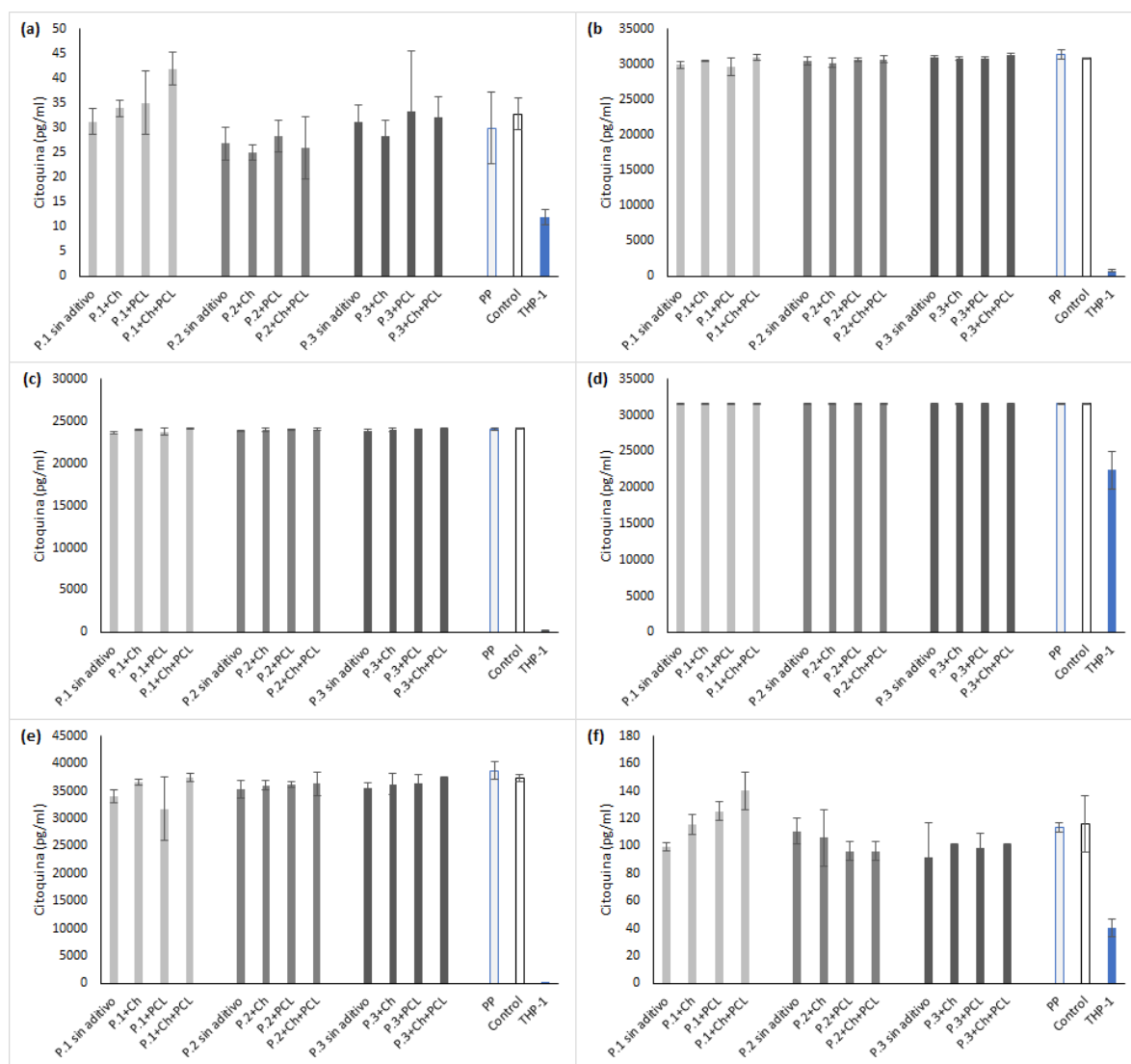


Figura 29. Citoquinas proinflamatorias con estimulación de LPS.

(a) INF- γ ; (b) TNF- α ; (c) IL-1 β ; (d) IL-8; (e) IL-6; (f) IL-2. PP: polipropileno como material de referencia; Control: medio de cultivo sin PUs; THP-1: monocitos de la línea celular. La concentración de citoquinas está dada como medias \pm S.D. (n=3).

Para los dos grupos (A y B) se evaluaron las citoquinas de los monocitos de las células THP-1, que no fueron transformados a macrófagos, para observar los niveles basales de

expresión de cada citoquina. De acuerdo con Chanput *et al.* (2010) las citoquinas de los monocitos y macrófagos de la línea celular de THP-1 en sus niveles basales presentan valores cercanos a los 20 y 30 pg ml⁻¹ [Chanput 2010]. Para el estudio realizado con los PUs se observa que las citoquinas de IFN GAMA, IL-2, IL-5, IL-6 presentaron valores dentro de ese rango mencionado por el estudio de Chanput *et al.* (2010) para los monocitos de THP-1, según se observa en las Figuras 27, 28, 29 y 30. Luego de la diferenciación de los monocitos a macrófagos se observa (Figura 27 y 28) que se incrementan los niveles de expresión de todas las citoquinas comparadas con los niveles basales de los monocitos. Las citoquinas antiinflamatorias IL-4, IL-5 e IL-10 presentan un incremento de 55, 65 y 35%, respectivamente. Para el caso de las citoquinas proinflamatorias IL-2, IL-6, IL-8, IL-1 β , IFN- γ , y TNF- α tienen un incremento de 65, 122, 29, 100, 70 y 97%, respectivamente. En cuanto a los resultados de los macrófagos estimulados con LPS, los porcentajes relacionados con el incremento de la concentración de las citoquinas son similares a los anteriores.

De acuerdo con el biomaterial de referencia empleado, el polipropileno (PP), y el control del medio sin PU se observa que el comportamiento no presenta diferencias estadísticas significativas con los PUs evaluados del grupo B, según se muestra en las Figuras 29 y 30. Con lo anterior se puede inferir que los PUs evaluados no presentan actividad antiinflamatoria.

De acuerdo con los resultados se pudo observar que para la diferenciación de monocitos de THP-1 a macrófagos es necesaria una estandarización y optimización *in vitro* para lograr resultados adecuados sobre la expresión de citoquinas. Los monocitos y macrófagos de la línea celular THP-1 podrían ser un modelo adecuado y confiable para evaluar la respuesta inflamatoria antes de realizar un estudio más detallado con células derivadas de humanos [Chanput 2010].

4.5 CONCLUSIONES

PUs sintetizados con polioles derivados del aceite de higuera, diisocianato de isoforona, utilizando como aditivos policaprolactona (15% p/p) y quitosano (3% p/p) se utilizaron para evaluar los procesos inflamatorios *in vitro* sobre la línea celular THP-1 por medio de la liberación de citoquinas al medio de cultivo luego de 24 h de exposición con los materiales. Se evaluaron tres citoquinas antiinflamatorias y 6 citoquinas proinflamatorias por medio de

citometría de flujo. Con los resultados se pudo inferir que los PUs sintetizados no generan inflamación a los macrófagos de la línea celular THP-1 con lo que se esperaría que dichos polímeros no desencadenen procesos inflamatorios cuando estén en contacto con tejidos humanos. Los PUs pueden ser candidatos como materiales para suturas biomédicas no absorbibles.

4.6 BIBLIOGRAFÍA

- Ballerini, P., Diomedede, F., Petragnani, N., Cicchitti, S., Merciaro, I., Cavalcanti, M. F. X. B., & Trubiani, O. (2017). Conditioned medium from relapsing-remitting multiple sclerosis patients reduces the expression and release of inflammatory cytokines induced by LPS-gingivalis in THP-1 and MO3.13 cell lines. *Cytokine*, *96*(December 2016), 261–272.
- Chanput, W., Mes, J., Vreeburg, R. A. M., Savelkoul, H. F. J., & Wichers, H. J. (2010). Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: A tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. *Food and Function*, *1*(3), 254–261.
- Dash, B. C., Thomas, D., Monaghan, M., Carroll, O., Chen, X., Woodhouse, K., ... Pandit, A. (2015). An injectable elastin-based gene delivery platform for dose- dependent modulation of angiogenesis and inflammation for critical limb ischemia. *Biomaterials*, *65*, 126–139.
- Dreskin, S. C., Thomas, G. W., Dale, S. N., & Heasley, L. E. (2001). Isoforms of Jun Kinase Are Differentially Expressed and Activated in Human Monocyte/Macrophage (THP-1) Cells. *The Journal of Immunology*, *166*(9), 5646–5653.
- Gómez Estrada, H. A., González Ruiz, K. N., & Medina, J. D. (2011). Actividad antiinflamatoria de productos naturales. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, *10*(3), 182–217.
- González, R., Zamora, Z., & Alonso, Y. (2009). Citocinas anti-inflamatorias y sus acciones y efectos en la sepsis y el choque séptico. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, *10*(9), 1–11.
- Lin, T. H., Yao, Z., Sato, T., Keeney, M., Li, C., Pajarinen, J., ... Goodman, S. B. (2014). Suppression of wear-particle-induced pro-inflammatory cytokine and chemokine

- production in macrophages via NF- κ B decoy oligodeoxynucleotide: A preliminary report. *Acta Biomaterialia*, 10(8), 3747–3755.
- Lund, M. E., To, J., O'Brien, B. A., & Donnelly, S. (2016). The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *Journal of Immunological Methods*, 430, 64–70.
- Oliveira, C. M., Sakata, R. K., Issy, A. M., & Gerola, L. R. (2011). Citocinas y dolor. *Revista Brasileira de Anestesiología*, 61(2), 137–142.
- Park, E. K., Jung, H. S., Yang, H. I., Yoo, M. C., Kim, C., & Kim, K. S. (2007). Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflammation Research*, 56, 45–50.
- Small, A., Lansdown, N., Al-Baghdadi, M., Quach, A., & Ferrante, A. (2018). Facilitating THP-1 macrophage studies by differentiating and investigating cell functions in polystyrene test tubes. *Journal of Immunological Methods*, (May), 0–1.
- Starr, T., Bauler, T. J., Malik-Kale, P., & Steele-Mortimer, O. (2018). The phorbol 12-myristate-13-acetate differentiation protocol is critical to the interaction of THP-1 macrophages with *Salmonella Typhimurium*. *PLoS ONE*, 13(3), 1–13.

EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LOS MATERIALES CANDIDATOS PARA EL DISEÑO DE SUTURAS BIOMÉDICAS

5.1 RESUMEN

Entre los polímeros que han ganado interés en aplicaciones biomédicas se encuentran los poliuretanos (PUs) que representan una clase importante de polímeros sintéticos. Por lo tanto, el desarrollo de PUs con propiedades biocompatibles es uno de los factores fundamentales de evaluación para el diseño de biomateriales. El objetivo de este capítulo fue realizar una evaluación *in vivo* de materiales tipo PU biocompatibles, no absorbibles, con propiedades mecánicas deseables para ser utilizados como materiales que cumplan con los requerimientos de suturas quirúrgicas no-absorbibles. Los materiales tipo PUs fueron sintetizados con polioles derivados del aceite de higuera y diisocianato de isoforona (IPDI). Los experimentos *in vivo* se realizaron durante 30 días en ratas wistar por medio de implantación subcutánea del PU a evaluar. Se observó que los materiales implantados no afectaron el proceso de curación de las heridas y tampoco presentaron efectos adversos ni lesiones severas en el tejido de la zona media cervical dorsal, ni en los cortes de los órganos (hígado, pulmón, bazo, páncreas, corazón, riñón) evaluados histológicamente. Los resultados indican que los PUs sintetizados con polioles derivados del aceite de higuera e IPDI pueden ser empleados en el diseño de biomateriales como materiales para suturas biomédicas no absorbibles.

5.2 INTRODUCCIÓN

Las interacciones que existen entre algunas líneas celulares con materiales diseñados para el área biomédica son de interés y existe bibliografía que se encarga de evaluar la respuesta *in vitro* de biomateriales a base de PUs [Vannozzi 2017a, Gossart 2018, Angeloni 2017, Meskinfam 2018]. Así, por ejemplo, Gossart *et al.* (2018) evaluaron la influencia intrínseca de la química de PUs sobre la modulación y activación de monocitos humanos *in vitro* encontrando posible aplicación de los materiales en terapias médicas [Gossart 2018]. Pero según se observa en la literatura antes citada, las respuestas *in vitro* permiten afirmar que los materiales pueden ser candidatos como biomateriales, pero no se tiene suficiente información

sobre la respuesta biológica cuando el material se implanta en un tejido vivo. Son pocos los estudios científicos que se han enfocado en la evaluación de los dos tipos de respuestas, *in vitro* e *in vivo* de biomateriales derivados de PUs. Uno de estos estudios corresponde el desarrollado por Zhang *et al.* (2016) quienes evaluaron la liberación de péptidos *in vitro* e *in vivo* a partir de PUs termoplásticos [Zhang 2016].

Considerando lo anterior, el objetivo de este capítulo fue realizar una evaluación *in vivo* de materiales tipo PUs biocompatibles, con propiedades mecánicas adecuadas para ser utilizados como materiales para suturas biomédicas no-absorbibles. Para lograr este propósito se utilizaron PUs sintetizados con polioles modificados derivados del aceite de higuera y diisocianato de isoforona (IPDI). El efecto de la modificación del poliol con adición de grupos hidroxilo fue evaluado sobre las propiedades biológicas *in vivo* en ratas wistar. Al correlacionar el comportamiento *in vivo* de los materiales con las propiedades mecánicas evaluadas en capítulos previos, se podrá determinar si los PUs pueden ser candidatos en aplicaciones biomédicas como suturas no absorbibles.

5.3 MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1 Animales

Para la experimentación se utilizaron animales SPF (Specific-pathogen-free) de rata wistar, machos de 8 semanas de edad con pesos promedios entre 200-250 g. Los animales no fueron sometidos a ningún tipo de procedimiento previo a la intervención del implante subcutáneo. Los animales fueron mantenidos en las instalaciones del laboratorio ABSL-2 en el Bioterio del Instituto Nacional de Salud (Colombia).

5.3.2 Ensayos *in vivo* de poliuretanos

Veintisiete machos adultos de rata wistar, con 8 semanas de edad (200-250 g), fueron mantenidas con ciclos de luz:oscuridad 12:12 horas y estuvieron alimentadas con alimento concentrado para roedores de fórmula abierta según los protocolos descritos por el Bioterio del Instituto Nacional de Salud (INS) de Colombia.

El protocolo experimental fue aprobado mediante decisión del comité de ética y el comité de uso de animales de laboratorio (CICUAL) y se realizó siguiendo los lineamientos dados

por el Bioterio del INS. Los animales se aclimataron en el entorno del laboratorio durante cinco días. Luego los animales fueron divididos en los siguientes grupos de forma aleatoria:

Grupo I: animales para cirugía con implantación de polímero sintetizado PU-P.1

Grupo II: animales para cirugía con implantación de polímero sintetizado PU-P.2

Grupo III: animales para cirugía con implantación de polímero sintetizado PU-P.3

Grupo IV: animales para cirugía con implantación de polímero comercial PP

Grupo V: animales para cirugía sin implantación de materiales - simulado

Grupo VI: animales sin cirugía – cero

De los grupos I al V se utilizó un n=5 y para el grupo VI fue un n=2. Los animales de los grupos del I al V fueron anestesiados con ketamina (80 mg kg^{-1}) y xilacina (10 mg kg^{-1}) por vía intraperitoneal. Se rasuró la región dorsal y se desinfectó la zona con solución antiséptica de clorhexidina digluconato (0,5 g por cada 100 ml). Se hizo una incisión de aproximadamente 1-2 cm en la línea media cervical dorsal, paralelo a la columna vertebral y entre las 2 escápulas. Mediante disección roma, se generó un bolsillo subcutáneo para implantar el material a evaluar. El material implantado consistió en fibras de 0,9 mm de diámetro, de 1 cm de largo y esterilizados previamente a la cirugía con UV. La incisión fue cerrada con un punto de polipropileno. Se realizó seguimiento de los animales durante 30 días.

Los animales del grupo VI se sacrificaron al iniciar el ensayo como un blanco (tiempo cero) por inhalación de dióxido de carbono y se colectaron los tejidos de la zona media cervical dorsal para evaluaciones histopatológicas. Adicionalmente se realizaron cortes de los órganos (hígado, pulmón, bazo, páncreas, corazón, riñón) para evaluaciones histológicas. Los tejidos y órganos se almacenaron en formaldehído bufferado al 10%.

Luego de 30 días todos los animales de los grupos I al V fueron sacrificados de la misma forma que el grupo VI y se retiró el tejido junto con el material implantado y los órganos para evaluaciones histopatológicas.

5.3.3 Análisis histopatológico

Los tejidos obtenidos de los 27 animales fueron embebidos en parafina, seccionados dentro de películas de $5 \mu\text{m}$ y teñidos usando hematoxilina y eosina. Cada película fue

analizada por dos patólogos de forma independiente (estudio doble ciego) y calificada entre cuatro niveles (ausencia, leve, moderado y severo) [Garg 2012].

5.3.4 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como valores promedios \pm desviación estándar (SD). Los datos fueron analizados por medio de un análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias significativas fueron determinadas para $p < 0,05$. Para la comparación entre muestras se utilizó la prueba t-Student con el Software SPSS Statistics 23.

5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular *in vitro*, se espera que los materiales sintetizados no presenten efectos tóxicos en un ensayo *in vivo*, considerando que son materiales no absorbibles lo que a su vez no presentará liberación de compuestos en el momento de ser implantado en un ser vivo. Uno de los objetivos con el ensayo *in vivo* fue comparar los PUs sintetizados con un biomaterial de PP sobre la respuesta de compatibilidad con el tejido. Es así como a todos los animales se les realizó un seguimiento del peso cada 7 días, y al finalizar el ensayo se determinó que todos los animales ganaron entre 120 y 180 g. No se observaron variaciones de los animales implantados con PUs con respecto a los que tenían implantado el material control de PP, así como tampoco con los animales que no tenían material implantado (simulado). De igual forma, no se observaron deficiencias relacionadas con el aspecto físico ni con la motricidad de los animales, sugiriendo que los materiales implantados no generan efectos adversos comparados con el material control.

En la Figura 30 se presentan imágenes de los tejidos en contacto con el material después de 30 días del implante de tres de los materiales evaluados, incluido el material control (PP).

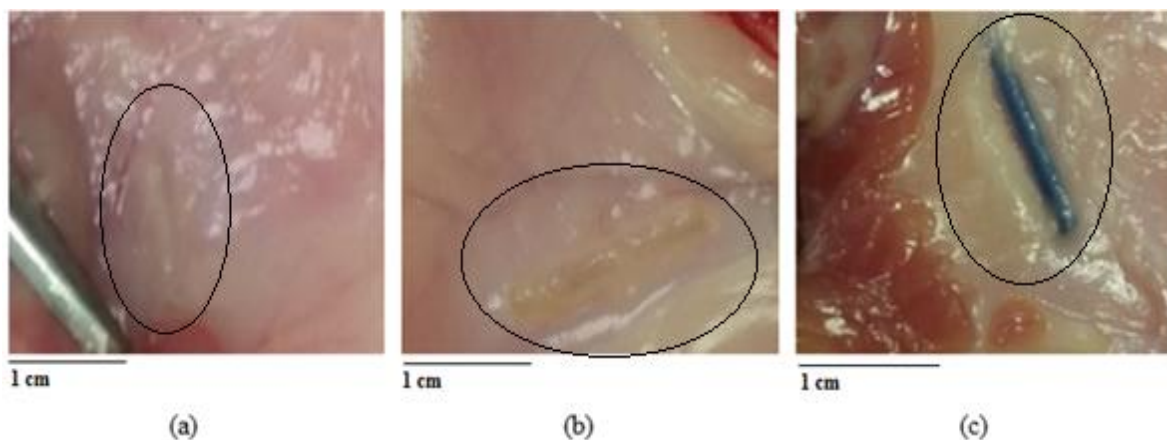


Figura 30. Imágenes de tejido de tres de los grupos de ratones al día 30 del experimento. (a) Piel con el material sintetizado con P.1 (PU-P.1), (b) Piel con el material sintetizado con P.2 (PU-P.2), (c) Piel con el material PP

Como se presenta en la Figura 30 los tejidos del área circundante no presentan signos de lesiones macroscópicas. Los resultados del ensayo *in vivo* mostraron que los tres tipos de PUs fueron integrados dentro del microambiente del tejido con reacciones de cuerpo extraño leves. Procesos similares se observaron con el material control empleado en el ensayo (PP). La fibrosis y la formación de gránulos en el tejido ocurren normalmente durante los procesos fisiológicos de cierre de heridas precedidos por la formación de escaras en el tejido [Laube 2017].

Se realizó un diagnóstico histopatológico de muestras de piel que consistió en una construcción y validación del sistema de puntuación histológico que combina parámetros de lesiones para definir cada categoría, de acuerdo con lo estipulado por Gibson-Corley *et al.* (2013) [Gibson-Corley 2013]. La puntuación de lesiones se realizó por dos patólogos independientes para cada individuo del grupo experimental. Se empleó una calificación semicuantitativa (evaluación por rangos) de las lesiones. Se determinaron cuatro rangos que corresponden a los siguientes valores: ausencia=0, leve=1, moderado=2, y severo=3. En la Tabla 3 se presenta un análisis estadístico de los 27 animales evaluados por los dos patólogos.

Tabla 3. Porcentaje de puntuación de lesiones del diagnóstico histopatológico.

Tipo de lesión	Calificación semicuantitativa por rangos			
	0	1	2	3
Hiperqueratosis ortoqueratótica	0%	30%	70%	0%
Hiperqueratosis paraqueratótica	100%	0%	0%	0%
Costra	78%	18%	4%	0%
Ulceración	100%	0%	0%	0%
Hipergranulosis	0%	93%	7%	0%
Acantosis	19%	59%	22%	0%
Exocitosis	81%	15%	4%	0%
Espongiosis	37%	63%	0%	0%
Necrosis/oncosis epitelial	70%	30%	0%	0%
Infiltrado dermis linfoplasmocitario	0%	83%	17%	0%
Infiltrado en dermis supurativo	89%	4%	7%	0%
Infiltrado en dermis eosinofílico	96%	4%	0%	0%
Infiltrado en dermis histocítico	78%	15%	7%	0%
Reacción piogranulomatosa	93%	0%	7%	0%
Tejido de granulación	100%	0%	0%	0%
Quiste folicular en dermis profunda	89%	0%	11%	0%

Notas: Los resultados de la calificación semicuantitativa de las lesiones están dados como la media \pm SD (n = 5). La calificación consiste en: 0 = ausencia, 1= leve, 2 = moderado, y 3 = severo.

En los análisis histopatológicos los puntajes más altos indican una lesión mayor (severo=3) [Inzana 2016]. En la Tabla 3 se observa que el valor más alto corresponde a la puntuación 3 (severo), y de acuerdo con el análisis estadístico de los resultados histopatológicos de los 27 animales, no se presentaron valores severos para las lesiones evaluadas (Figura 31). En la Figura 31 se observa que el 64% de las lesiones están ausentes en los animales evaluados, con lo que se puede deducir que las lesiones generadas corresponden a reacciones desencadenadas por la presencia de un material extraño en el organismo vivo.

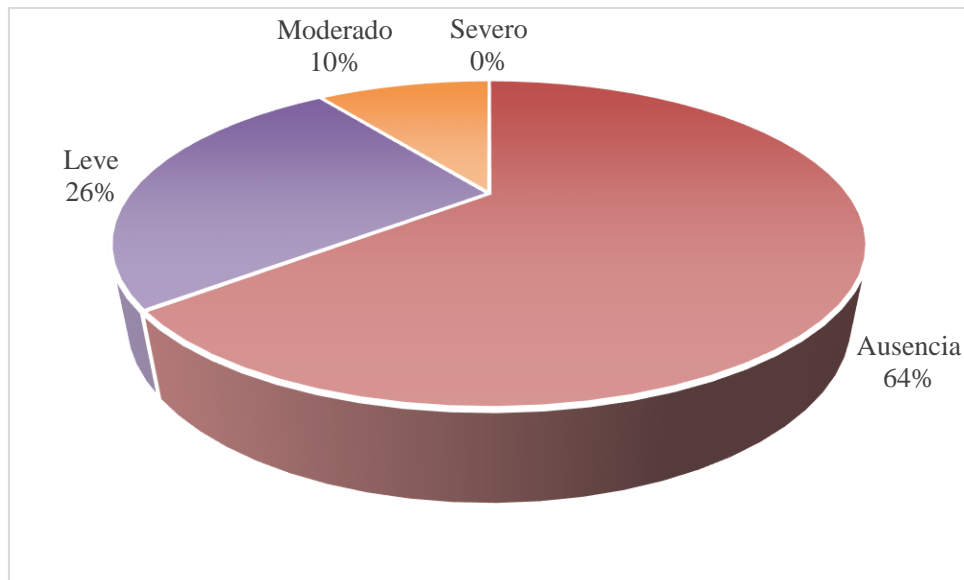


Figura 31. Clasificación de las lesiones presentadas en el análisis histopatológico de los animales.
 Notas: Los resultados son presentados como la media \pm SD (n=5) y corresponde a las valoraciones de dos patólogos diferentes.

De acuerdo con la impresión diagnóstica se observó que con los animales del grupo I (PU-P.1), el 80% de los animales presentaron dermatitis linfoplasmocitaria leve y el 20% restante presentaron dermatitis linfoplasmocitaria moderada. Con relación al grupo II (PU-P.2), el 20% presentaron dermatitis mixta leve, un 60% de las lesiones correspondían a dermatitis linfoplasmocitaria leve, y un 20% de las lesiones fueron dermatitis piogranulomatosa moderada. Adicional a esto, el 80% de los animales implantados con los materiales del grupo III (PU-P.3) presentaron dermatitis linfoplasmocitaria leve, y el 20% tenían dermatitis piogranulomatosa moderada. Los animales que tenían el tratamiento del grupo IV (PP) presentaron un 20% de piel sana, 60% tenían dermatitis linfoplasmocitaria leve y el 20% restante tenían dermatitis linfoplasmocitaria moderada. De igual forma, se observó que el 100% de los animales que correspondían al grupo V (simulado) presentaron dermatitis linfoplasmocitaria leve.

Según se observa en el análisis anterior y basados en la descripción macroscópica, se puede afirmar que las lesiones presentadas corresponden a una respuesta a cuerpo extraño y no se deben a reacciones adversas por el material implantado. Adicional a esto, al comparar los materiales sintetizados con el material comercial (PP) la respuesta obtenida es similar. Esto se puede observar en las fotografías microscópicas presentadas en la Figura 32, donde

se muestran los materiales que presentaron un grado de lesión mayor comparado con los otros materiales evaluados.

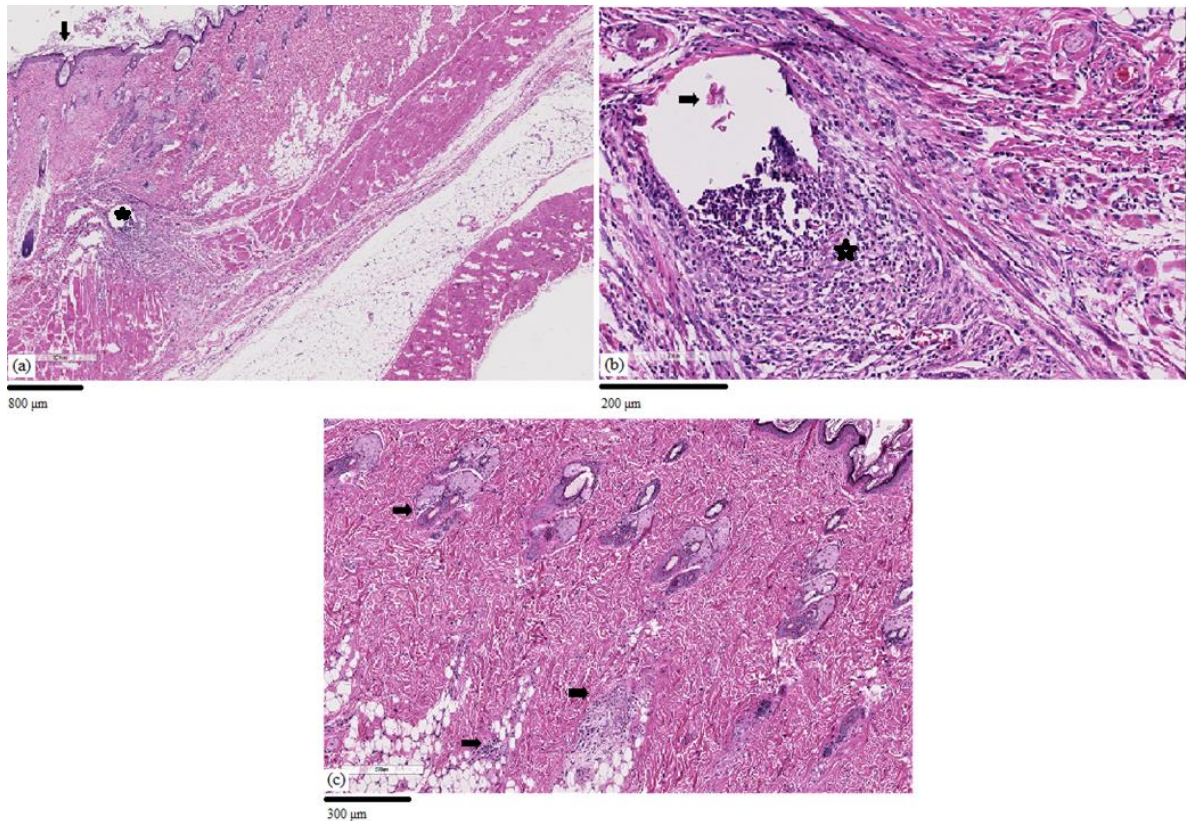


Figura 32. Descripción macroscópica de lesiones presentadas en los animales.
(a) Engrosamiento de la epidermis leve (flecha), dermatitis piogranulomatosa moderada como respuesta a cuerpo extraño (asterisco) con material PU-P.2. Tinción H&E 20X (b) Dermatitis piogranulomatosa moderada como respuesta a cuerpo extraño (flecha) con presencia de células epitelioides, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas, PMN-eosinófilos y neutrófilos (asterisco) con el material PU-P.2. Tinción H&E 200X. (c) Dermatitis linfohistiocitaria multifocal leve asociada a los anexos y al tejido adiposo (flechas) con material comercial PP. Tinción H&E 80X.

En la Figura 32 se presentan las fotografías de dos de los materiales evaluados PU-P.3 y PP correspondientes a los grupos III y IV, respectivamente. De acuerdo con la información obtenida en las imágenes histológicas, se puede afirmar que las lesiones presentadas en los animales corresponden a una reacción normal de cuerpo extraño al ser comparadas con el material comercial empleado como control (PP).

De acuerdo con los resultados relacionados con los ensayos *in vivo*, se puede inferir que los PUs sintetizados en este proyecto y el material control de PP, presentaron una respuesta positiva al ser implantados en ratas wistar. De igual forma, las lesiones generadas luego de

30 días de ensayo no presentan respuestas lesiones severas, ni respuestas inflamatorias de consideración. Valores similares se encontraron en evaluaciones *in vivo* de PUs sintetizados con nanopartículas de hidroxiapatita, un poliol derivado del fruto de *açai* y diisocianato de hexametileno y encontraron una integración positiva entre el material y el cuerpo del animal sin respuestas inflamatorias a gran escala para el control y los PUs [Gabriel 2017].

PUs biodegradables y sus productos de degradación pueden ser no tóxicos y causar una mínima respuesta *in vivo*, lo cual puede ser mejorado gracias a la composición o métodos de preparación [Ng 2017b]. Es así como se puede inferir que los PUs sintetizados pueden ser empleados como matriz para el diseño de biomateriales como suturas no absorbibles.

5.5 CONCLUSIONES

Los PUs sintetizados con polioles derivados del aceite de higuera (*Ricinus communis*) (P.1, P.2 y P.3) y diisocianato de isoforona (IPDI) que presentaron propiedades con potencial para aplicaciones relacionadas con los sistemas para cierre de heridas (mecánicas y biológicas) fueron evaluados *in vivo* en ratas wistar, para determinar si dichos materiales pueden ser empleados en contacto directo con la piel sin generar daño a las células circundantes. Es así como se realizó un implante subcutáneo de los PUs en ratas wistar durante 30 días. Los resultados no presentaron diferencias significativas de los PUs comparados con el material control de polipropileno. Se presentaron reacciones de cuerpo extraño normales debidas al proceso del injerto del material. Se pudo deducir que no se presentaron lesiones crónicas, indicando que los materiales pueden estar en contacto con tejidos de piel. De acuerdo con los resultados se puede proponer a los PUs sintetizados con polioles del aceite de higuera como materiales candidatos para el diseño de suturas biomédicas no-absorbibles.

5.6 BIBLIOGRAFÍA

Angeloni, V., Contessi, N., De Marco, C., Bertoldi, S., Tanzi, M. C., Daidone, M. G., & Farè, S. (2017). Polyurethane foam scaffold as *in vitro* model for breast cancer bone metastasis. *Acta Biomaterialia*, 63, 306–316.

Gabriel, L. P., Santos, M. E. M. do., Jardini, A. L., Bastos, G. N. T., Dias, C. G. B. T.,

- Webster, T. J., & Maciel Filho, R. (2017). Bio-based polyurethane for tissue engineering applications: How hydroxyapatite nanoparticles influence the structure, thermal and biological behavior of polyurethane composites. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *13*(1), 201–208.
- Garg, B., Sandhu, V., Sood, N., Sood, A., & Malhotra, V. (2012). Histopathological analysis of chronic gastritis and correlation of pathological features with each other and with endoscopic findings. *Polish Journal of Pathology*, *63*(3), 172–178.
- Gibson-Corley, K. N., Olivier, A. K., & Meyerholz, D. K. (2013). Principles for Valid Histopathologic Scoring in Research. *Veterinary Pathology*, *50*(6), 1007–1015.
- Gossart, A., Battiston, K. G., Gand, A., Pauthe, E., & Santerre, J. P. (2018). Mono vs multilayer fibronectin coatings on polar/hydrophobic/ionic polyurethanes: Altering surface interactions with human monocytes. *Acta Biomaterialia*, *66*, 129–140.
- Inzana, J. A., Schwarz, E. M., Kates, S. L., & Awad, H. A. (2016). Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis. *Biomaterials*, *81*, 58–71.
- Laube, T., Weisser, J., Berger, S., Börner, S., Bischoff, S., Schubert, H., ... Schnabelrauch, M. (2017). In situ foamable, degradable polyurethane as biomaterial for soft tissue repair. *Materials Science and Engineering C*, *78*, 163–174.
- Meskinfam, M., Bertoldi, S., Albanese, N., Cerri, A., Tanzi, M. C., Imani, R., ... Farè, S. (2018). Polyurethane foam/nano hydroxyapatite composite as a suitable scaffold for bone tissue regeneration. *Materials Science and Engineering C*, *82*(August 2017), 130–140.
- Ng, W. S., Lee, C. S., Chuah, C. H., & Cheng, S. F. (2017). Preparation and modification of water-blown porous biodegradable polyurethane foams with palm oil-based polyester polyol. *Industrial Crops and Products*, *97*, 65–78.
- Vannozzi, L., Ricotti, L., Santaniello, T., Terencio, T., Oropesa-Nunez, R., Canale, C., ... Gerges, I. (2017). 3D porous polyurethanes featured by different mechanical properties: Characterization and interaction with skeletal muscle cells. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *75*(July), 147–159.
- Zhang, J., Woodruff, T. M., Clark, R. J., Martin, D. J., & Minchin, R. F. (2016). Release of bioactive peptides from polyurethane films in vitro and in vivo: Effect of polymer composition. *Acta Biomaterialia*, *41*, 264–272.

El objetivo de esta investigación fue sintetizar PUs a partir de polioles derivados de aceite de higuerilla para aplicaciones biomédicas como materiales para suturas no absorbibles. Las conclusiones logradas de la investigación son las siguientes.

Se determinó la relación de las propiedades fisicoquímicas, mecánicas, térmicas y morfológicas de los materiales para suturas en función de la estructura química de los monómeros y aditivos empleados para la síntesis de la siguiente forma. Uno de los monómeros empleados correspondía al tipo de diisocianato. Por lo tanto, se sintetizaron 144 matrices de PUs con tres tipos de diisocianatos alifáticos, el primero lineal, el segundo con un anillo y el tercero con dos anillos en la estructura. Se determinó que la estructura de los diisocianatos tiene un efecto sobre las propiedades mecánicas y térmicas de los PUs debido al impedimento estérico que presenta la estructura de los mismos. Por lo tanto, la presencia de los anillos en la estructura mejoró las propiedades mecánicas comparado con el diisocianato con estructura lineal.

El grado de entrecruzamiento presentó un efecto significativo sobre diversas propiedades evaluadas, como las propiedades mecánicas, las propiedades térmicas, el carácter degradable de los PUs, entre otras. Esto se pudo corroborar por medio de la determinación de las propiedades mecánicas, las cuales mejoraron con los polioles modificados químicamente, aumentando la resistencia a la rotura y el porcentaje de elongación. El efecto observado sobre las propiedades térmicas se atribuye al entrecruzamiento ya que la movilidad de las cadenas es menor, por la distancia entre nudos, lo que hace que los valores de la T_g sean elevados, para los materiales sintetizados con polioles modificados químicamente. Lo anterior también se puede correlacionar con el carácter degradable de los materiales debido a que la difusión de las cadenas está impedida por el grado de entrecruzamiento, lo que puede dificultar la cantidad de agua que difunde a través de la red. Es así como se observó una degradación a nivel superficial de los materiales por medio de microscopía.

En cuanto a las propiedades morfológicas se observó que los materiales presentaron una distribución homogénea de las fases lo que se pudo confirmar por medio del análisis de la

microestructura y por la determinación de las propiedades térmicas donde se obtuvo un solo valor de T_g .

Al determinar el posible efecto de los aditivos (PCL y Ch) empleados en la síntesis de los PUs sobre las propiedades evaluadas, se observó que el uso de Ch no presentó efectos significativos sobre alguna de las propiedades, probablemente por la concentración empleada. Para el caso de la PCL se observó que tiene un efecto sobre las propiedades mecánicas, siendo estas inferiores a medida que se incrementaba la concentración de la PCL.

Es así como se determinó la biocompatibilidad *in vitro* de los materiales para suturas que presentaron propiedades fisicoquímicas, mecánicas y morfológicas deseables en función de la estructura de los segmentos y la densidad de entrecruzamiento de los PUs. Teniendo en cuenta los resultados anteriores de las propiedades evaluadas, se seleccionaron las matrices sintetizadas con el diisocianato IPDI y con los tres tipos de polioles y con los aditivos de PCL y Ch, para continuar con la investigación. Esto se hizo con base en las propiedades requeridas para que los PUs pudiesen ser aptos como materiales para suturas biomédicas.

Se realizaron pruebas *in vitro* sobre las siguientes líneas celulares de fibroblastos: fibroblastos de ratón L-929, fibroblastos humanos MRC-5 y la línea celular de fibroblasto dérmico humano HDFa, sobre los materiales por el método ISO 10993-5. Se determinó que para todas las líneas celulares evaluadas, los valores de viabilidad celular fueron superiores al 80%, con lo que se puede inferir que los PUs pueden ser utilizados como biomateriales ya que no afectan las células de fibroblastos en contacto directo. Adicional a esto se realizó un ensayo de inmunocitoquímica por medio de la tinción de faloidina, que tiñe las fibras de la actina-F que es un componente principal del citoesqueleto generando una coloración verde. Y una tinción de los núcleos de los fibroblastos por medio de la coloración azul generada por la tinción DAPI. En las imágenes se observó que la estructura de la línea celular se conserva y que las células se adhieren al PU sin problema.

De otro lado, se determinó que los PUs presentan actividad antibacteriana contra *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Lo que puede ser beneficioso para la aplicación seleccionada ya que evita procesos adicionales de los materiales.

Dado que los aditivos al parecer no presentan un efecto de mejora en la biocompatibilidad, a continuación, se seleccionaron las matrices sintetizadas con IPDI, pero con los valores máximos de PCL y Ch para evaluar el posible efecto inflamatorio que presentaban los materiales para suturas no absorbibles obtenidas. Se evaluó la respuesta inflamatoria por medio de la expresión de citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-5, IL-10) y proinflamatorias (IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α) expresadas en un modelo celular como son las células THP-1 con y sin estímulo de lipopolisacárido (LPS) por medio del kit MILLIPLEX[®] MAP. Se utilizó un biomaterial comercial de referencia, el PP, para comparar los resultados obtenidos de los PUs. Se determinó que los PUs no presentan actividad antiinflamatoria. De otro lado según los resultados se puede inferir que los PUs no generan inflamación sobre la línea celular evaluada, con lo que se podría inferir que los PUs pueden ser candidatos como materiales de suturas biomédicas no absorbibles.

Por último, y con base en los resultados previos, se seleccionaron las matrices sintetizadas con IPDI y con los tres tipos de polioliol para realizar la evaluación *in vivo* de los materiales candidatos como materiales para el diseño de suturas biomédicas. Para el ensayo *in vivo* se realizaron implantes de fibras de 0,9 mm de diámetro y de 1 cm de largo en la región dorsal de ratas wistar. El implante se mantuvo durante 30 días. Se observó que los materiales implantados no afectaron el proceso de curación de las heridas y tampoco presentaron efectos adversos, ni lesiones severas en el tejido de la zona media cervical dorsal, ni en los cortes de los órganos (hígado, pulmón, bazo, páncreas, corazón, riñón) evaluados histológicamente. Con los resultados se puede inferir que los PUs sintetizados con polioles derivados del aceite de higuera (P.2 y P.3) y con IPDI pueden ser empleados como materiales para suturas biomédicas no absorbibles.

Como perspectivas futuras se recomienda diseñar hilos de poliuretanos sintetizados con diisocianato de isoforona con los polioles P.2 y P.3, con un diámetro adecuado (<0,4 mm de diámetro) para ser utilizados como suturas biomédicas no absorbibles. Realizar ensayos *in vivo* de los hilos para determinar la tensión antes y después de estar en contacto con el tejido.

Realizar ensayos *in vivo* de absorción de los materiales candidatos como suturas biomédicas para determinar posibles efectos que puedan generar los productos de degradación.

Utilizar un método alternativo en el proceso de síntesis de poliuretanos para lograr incrementar el porcentaje de quitosano empleado, el cual fue del 3% (p/p), y con eso buscar una mejora de las propiedades biológicas aprovechando las propiedades de biocompatibilidad que posee el quitosano.

ANEXO 1. POLIURETANOS SINTETIZADOS

Anexo 1.1. Polioli 1: P.1 (Aceite de higuera sin modificar)

Código PU	Nombre PU	Diisocianato	PCL (% p/p)	Ch (% p/p)
1	P.1-HDI-0PCL-0Ch		0	0
2	P.1-HDI-0PCL-1Ch		0	1
3	P.1-HDI-0PCL-2Ch		0	2
4	P.1-HDI-0PCL-3Ch		0	3
5	P.1-HDI-5PCL-0Ch		5	0
6	P.1-HDI-5PCL-1Ch		5	1
7	P.1-HDI-5PCL-2Ch		5	2
8	P.1-HDI-5PCL-3Ch	HDI (diisocianato de hexametileno)	5	3
9	P.1-HDI-10PCL-0Ch		10	0
10	P.1-HDI-10PCL-1Ch		10	1
11	P.1-HDI-10PCL-2Ch		10	2
12	P.1-HDI-10PCL-3Ch		10	3
13	P.1-HDI-15PCL-0Ch		15	0
14	P.1-HDI-15PCL-1Ch		15	1
15	P.1-HDI-15PCL-2Ch		15	2
16	P.1-HDI-15PCL-3Ch		15	3
17	P.1-IPDI-0PCL-0Ch		0	0
18	P.1-IPDI-0PCL-1Ch		0	1
19	P.1-IPDI-0PCL-2Ch		0	2
20	P.1-IPDI-0PCL-3Ch		0	3
21	P.1-IPDI-5PCL-0Ch		5	0
22	P.1-IPDI-5PCL-1Ch		5	1
23	P.1-IPDI-5PCL-2Ch		5	2
24	P.1-IPDI-5PCL-3Ch	IPDI (diisocianato de isofoforona)	5	3
25	P.1-IPDI-10PCL-0Ch		10	0
26	P.1-IPDI-10PCL-1Ch		10	1
27	P.1-IPDI-10PCL-2Ch		10	2
28	P.1-IPDI-10PCL-3Ch		10	3
29	P.1-IPDI-15PCL-0Ch		15	0
30	P.1-IPDI-15PCL-1Ch		15	1
31	P.1-IPDI-15PCL-2Ch		15	2
32	P.1-IPDI-15PCL-3Ch		15	3

33	P.1-HMDI-0PCL-0Ch		0	0
34	P.1-HMDI-0PCL-1Ch		0	1
35	P.1-HMDI-0PCL-2Ch		0	2
36	P.1-HMDI-0PCL-3Ch		0	3
37	P.1-HMDI-5PCL-0Ch		5	0
38	P.1-HMDI-5PCL-1Ch		5	1
39	P.1-HMDI-5PCL-2Ch		5	2
40	P.1-HMDI-5PCL-3Ch	HMDI (4,4'- metilenbis(isocianato de ciclohexilo))	5	3
41	P.1-HMDI-10PCL-0Ch		10	0
42	P.1-HMDI-10PCL-1Ch		10	1
43	P.1-HMDI-10PCL-2Ch		10	2
44	P.1-HMDI-10PCL-3Ch		10	3
45	P.1-HMDI-15PCL-0Ch		15	0
46	P.1-HMDI-15PCL-1Ch		15	1
47	P.1-HMDI-15PCL-2Ch		15	2
48	P.1-HMDI-15PCL-3Ch	15	3	

Anexo 1.2. Polioli 2: P.2 (1,32 % mol de pentaeritritol/mol de aceite de higuera)

Código PU	Nombre PU	Diisocianato	PCL (% p/p)	Ch (% p/p)
49	P.2-HDI-0PCL-0Ch		0	0
50	P.2-HDI-0PCL-1Ch		0	1
51	P.2-HDI-0PCL-2Ch		0	2
52	P.2-HDI-0PCL-3Ch		0	3
53	P.2-HDI-5PCL-0Ch		5	0
54	P.2-HDI-5PCL-1Ch		5	1
55	P.2-HDI-5PCL-2Ch		5	2
56	P.2-HDI-5PCL-3Ch	HDI (diisocianato de hexametileno)	5	3
57	P.2-HDI-10PCL-0Ch		10	0
58	P.2-HDI-10PCL-1Ch		10	1
59	P.2-HDI-10PCL-2Ch		10	2
60	P.2-HDI-10PCL-3Ch		10	3
61	P.2-HDI-15PCL-0Ch		15	0
62	P.2-HDI-15PCL-1Ch		15	1
63	P.2-HDI-15PCL-2Ch		15	2
64	P.2-HDI-15PCL-3Ch	15	3	

65	P.2-IPDI-0PCL-0Ch		0	0
66	P.2-IPDI-0PCL-1Ch		0	1
67	P.2-IPDI-0PCL-2Ch		0	2
68	P.2-IPDI-0PCL-3Ch		0	3
69	P.2-IPDI-5PCL-0Ch		5	0
70	P.2-IPDI-5PCL-1Ch		5	1
71	P.2-IPDI-5PCL-2Ch		5	2
72	P.2-IPDI-5PCL-3Ch	IPDI (diisocianato de isoforona)	5	3
73	P.2-IPDI-10PCL-0Ch		10	0
74	P.2-IPDI-10PCL-1Ch		10	1
75	P.2-IPDI-10PCL-2Ch		10	2
76	P.2-IPDI-10PCL-3Ch		10	3
77	P.2-IPDI-15PCL-0Ch		15	0
78	P.2-IPDI-15PCL-1Ch		15	1
79	P.2-IPDI-15PCL-2Ch		15	2
80	P.2-IPDI-15PCL-3Ch		15	3
81	P.2-HMDI-0PCL-0Ch			0
82	P.2-HMDI-0PCL-1Ch		0	1
83	P.2-HMDI-0PCL-2Ch		0	2
84	P.2-HMDI-0PCL-3Ch		0	3
85	P.2-HMDI-5PCL-0Ch		5	0
86	P.2-HMDI-5PCL-1Ch		5	1
87	P.2-HMDI-5PCL-2Ch		5	2
88	P.2-HMDI-5PCL-3Ch	HMDI (4,4'-metilenbis(isocianato de ciclohexilo))	5	3
89	P.2-HMDI-10PCL-0Ch		10	0
90	P.2-HMDI-10PCL-1Ch		10	1
91	P.2-HMDI-10PCL-2Ch		10	2
92	P.2-HMDI-10PCL-3Ch		10	3
93	P.2-HMDI-15PCL-0Ch		15	0
94	P.2-HMDI-15PCL-1Ch		15	1
95	P.2-HMDI-15PCL-2Ch		15	2
96	P.2-HMDI-15PCL-3Ch		15	3

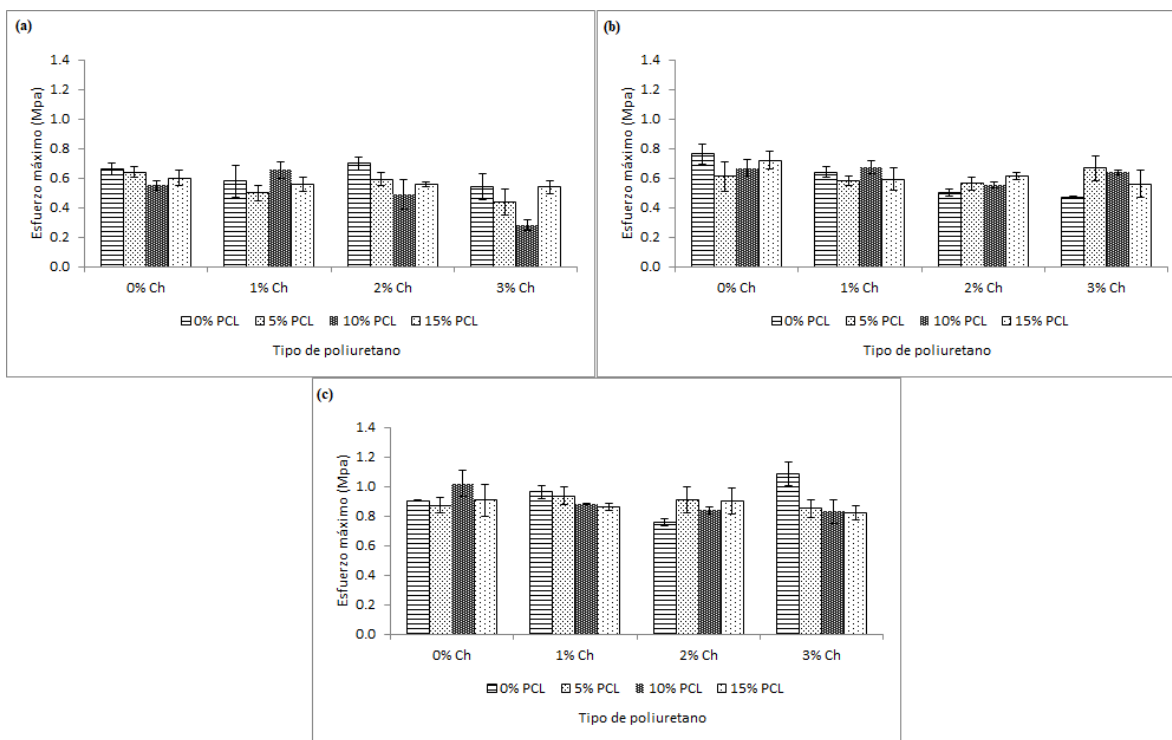
Anexo 1.3. Polioli 3: P.3 (2,64 % mol de pentaeritritol/mol de aceite de higuera)

Código PU	Nombre PU	Diisocianato	PCL (% p/p)	Ch (% p/p)
97	P.3-HDI-0PCL-0Ch		0	0
98	P.3-HDI-0PCL-1Ch		0	1
99	P.3-HDI-0PCL-2Ch		0	2
100	P.3-HDI-0PCL-3Ch		0	3
101	P.3-HDI-5PCL-0Ch		5	0
102	P.3-HDI-5PCL-1Ch		5	1
103	P.3-HDI-5PCL-2Ch		5	2
104	P.3-HDI-5PCL-3Ch	HDI (diisocianato de hexametileno)	5	3
105	P.3-HDI-10PCL-0Ch		10	0
106	P.3-HDI-10PCL-1Ch		10	1
107	P.3-HDI-10PCL-2Ch		10	2
108	P.3-HDI-10PCL-3Ch		10	3
109	P.3-HDI-15PCL-0Ch		15	0
110	P.3-HDI-15PCL-1Ch		15	1
111	P.3-HDI-15PCL-2Ch		15	2
112	P.3-HDI-15PCL-3Ch		15	3
113	P.3-IPDI-0PCL-0Ch		0	0
114	P.3-IPDI-0PCL-1Ch		0	1
115	P.3-IPDI-0PCL-2Ch		0	2
116	P.3-IPDI-0PCL-3Ch		0	3
117	P.3-IPDI-5PCL-0Ch		5	0
118	P.3-IPDI-5PCL-1Ch		5	1
119	P.3-IPDI-5PCL-2Ch		5	2
120	P.3-IPDI-5PCL-3Ch	IPDI (diisocianato de isoforona)	5	3
121	P.3-IPDI-10PCL-0Ch		10	0
122	P.3-IPDI-10PCL-1Ch		10	1
123	P.3-IPDI-10PCL-2Ch		10	2
124	P.3-IPDI-10PCL-3Ch		10	3
125	P.3-IPDI-15PCL-0Ch		15	0
126	P.3-IPDI-15PCL-1Ch		15	1
127	P.3-IPDI-15PCL-2Ch		15	2
128	P.3-IPDI-15PCL-3Ch		15	3
129	P.3-HMDI-0PCL-0Ch		0	0
130	P.3-HMDI-0PCL-1Ch		0	1

131	P.3-HMDI-0PCL-2Ch		0	2
132	P.3-HMDI-0PCL-3Ch		0	3
133	P.3-HMDI-5PCL-0Ch		5	0
134	P.3-HMDI-5PCL-1Ch		5	1
135	P.3-HMDI-5PCL-2Ch		5	2
136	P.3-HMDI-5PCL-3Ch		5	3
137	P.3-HMDI-10PCL-0Ch	HMDI (4,4'- metilenbis(isocianato de ciclohexilo))	10	0
138	P.3-HMDI-10PCL-1Ch		10	1
139	P.3-HMDI-10PCL-2Ch		10	2
140	P.3-HMDI-10PCL-3Ch		10	3
141	P.3-HMDI-15PCL-0Ch		15	0
142	P.3-HMDI-15PCL-1Ch		15	1
143	P.3-HMDI-15PCL-2Ch		15	2
144	P.3-HMDI-15PCL-3Ch		15	3

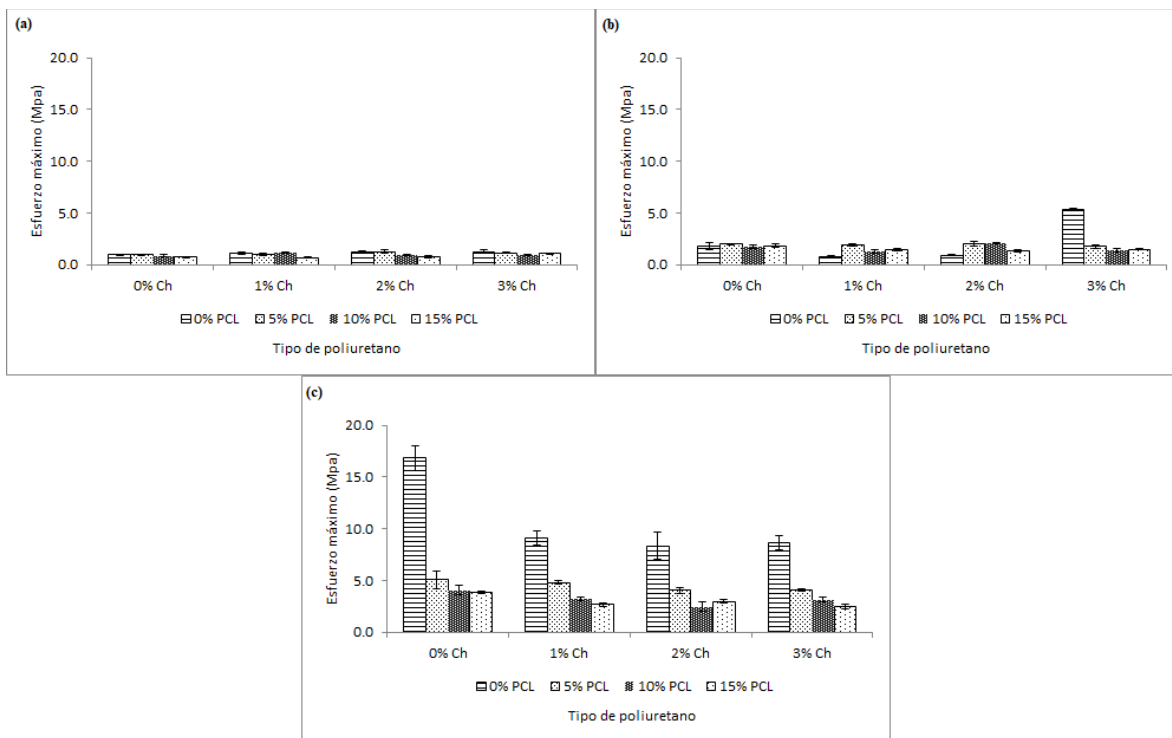
ANEXO 2. PROPIEDADES MECÁNICAS DE LOS PUs

Anexo 2.1. Resultados de esfuerzo máximo de los PUs sintetizados con HDI



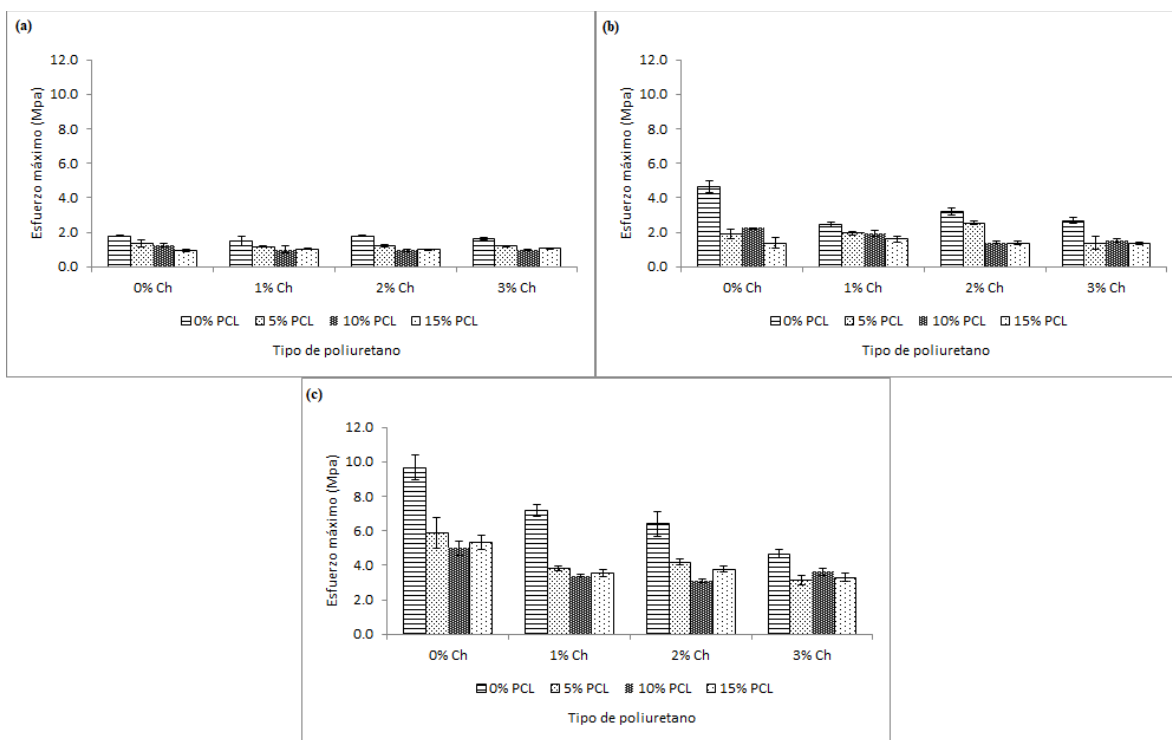
Notas: (a) materiales sintetizados con el polirol P.1, (b) materiales sintetizados con el polirol P.2, (c) materiales sintetizados con el polirol P.3. Los resultados de esfuerzo máximo están dados como $\text{media} \pm \text{SD}$ ($n=3$).

Anexo 2.2. Resultados de esfuerzo máximo de los PUs sintetizados con IPDI



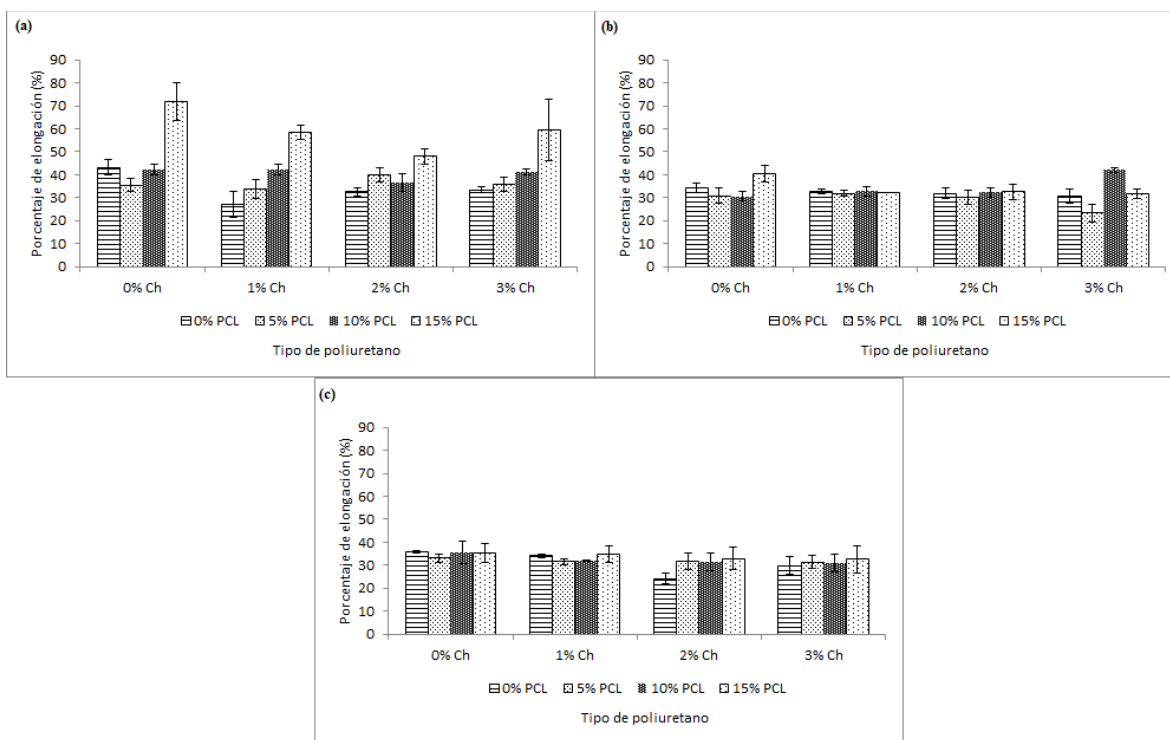
Notas: (a) materiales sintetizados con el polirol P.1, (b) materiales sintetizados con el polirol P.2, (c) materiales sintetizados con el polirol P.3. Los resultados de esfuerzo máximo están dados como $\text{media} \pm \text{SD}$ ($n=3$).

Anexo 2.3. Resultados de esfuerzo máximo de los PUs sintetizados con HMDI



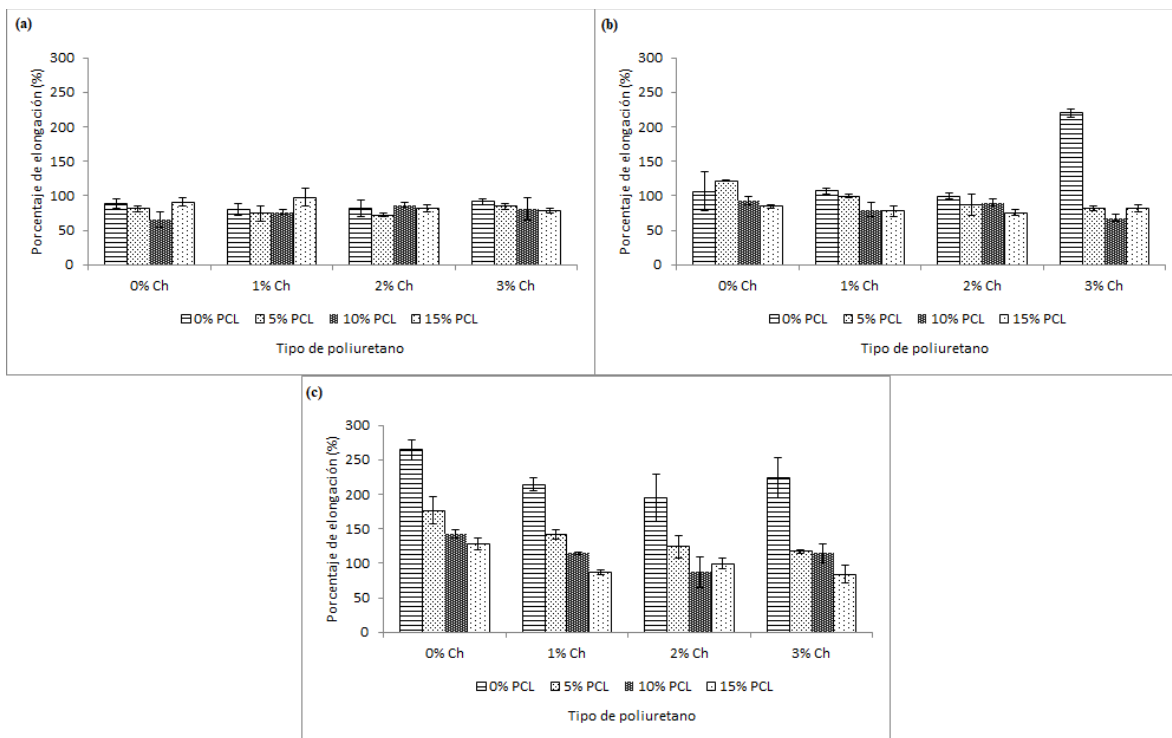
Notas: (a) materiales sintetizados con el polirol P.1, (b) materiales sintetizados con el polirol P.2, (c) materiales sintetizados con el polirol P.3. Los resultados de esfuerzo máximo están dados como $\text{media} \pm \text{SD}$ ($n=3$).

Anexo 2.4. Resultados del porcentaje de elongación de PUs sintetizados con HDI



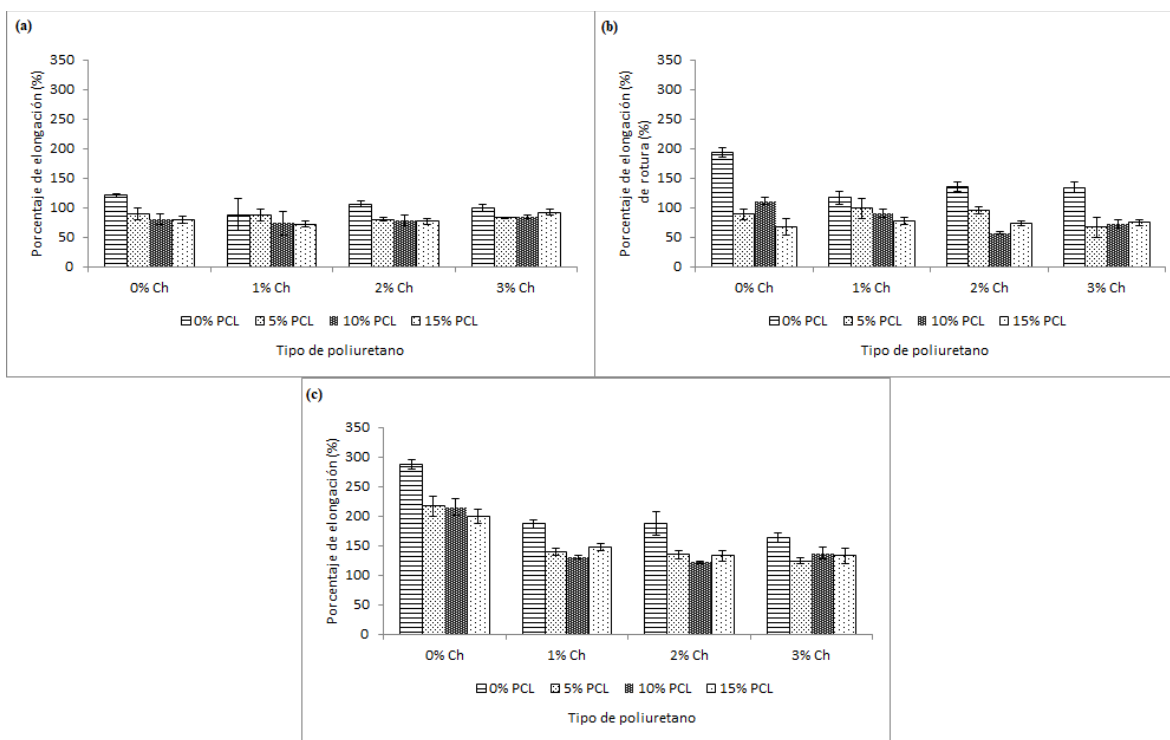
Notas: (a) materiales sintetizados con el polirol P.1, (b) materiales sintetizados con el polirol P.2, (c) materiales sintetizados con el polirol P.3. Los resultados de porcentaje de elongación están dados como media \pm SD (n=3).

Anexo 2.5. Resultados del porcentaje de elongación de PUs sintetizados con IPDI



Notas: (a) materiales sintetizados con el polirol P.1, (b) materiales sintetizados con el polirol P.2, (c) materiales sintetizados con el polirol P.3. Los resultados de porcentaje de elongación están dados como $\text{media} \pm \text{SD}$ ($n=3$).

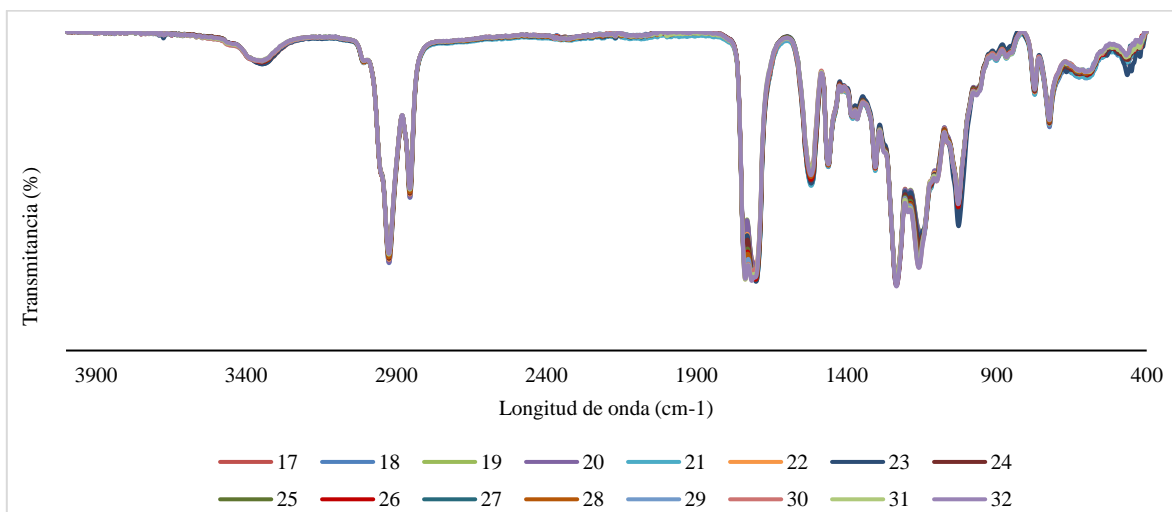
Anexo 2.6. Resultados del porcentaje de elongación de PUs sintetizados con HMDI



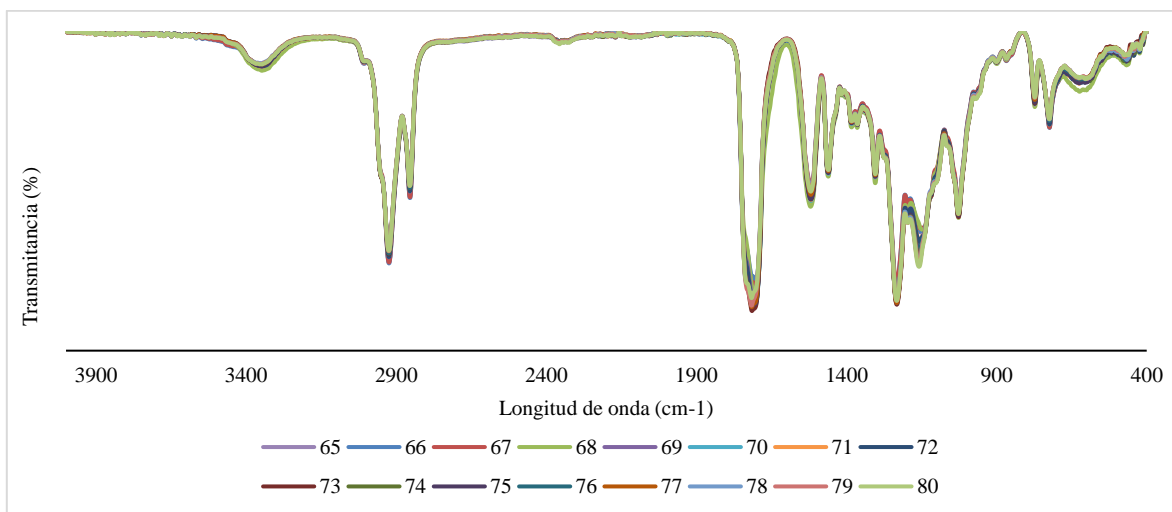
Notas: (a) materiales sintetizados con el polirol P.1, (b) materiales sintetizados con el polirol P.2, (c) materiales sintetizados con el polirol P.3. Los resultados de porcentaje de elongación están dados como $\text{media} \pm \text{SD}$ ($n=3$).

ANEXO 3. ESPECTRO FTIR DE LOS PUs

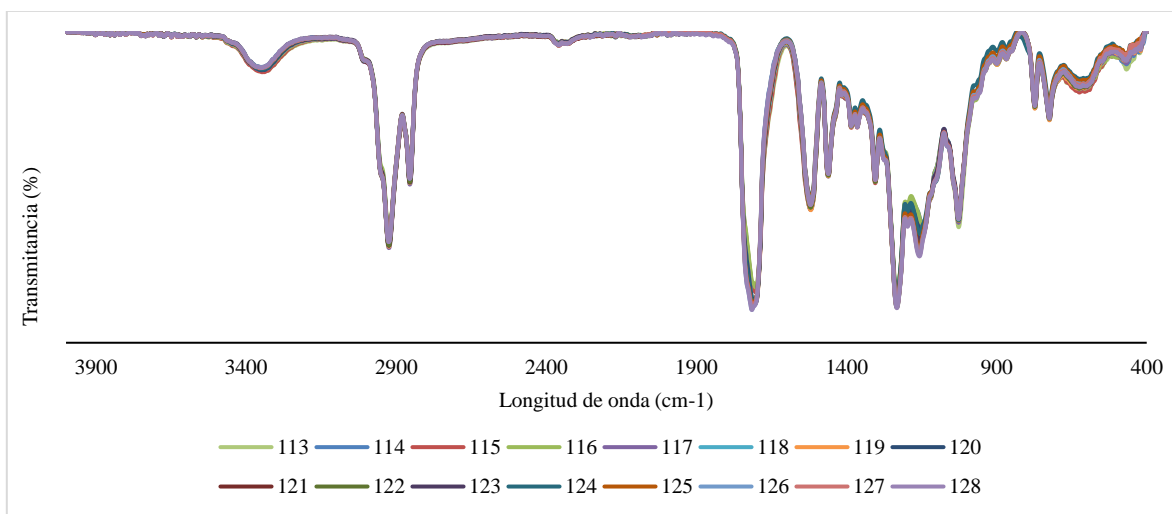
Anexo 3.1. Espectros FTIR para PUs sintetizados con el P.1 e IPDI



Anexo 3.2. Espectros FTIR para PUs sintetizados con el P.2 e IPDI



Anexo 3.3. Espectros FTIR para PUs sintetizados con el P.3 e IPDI

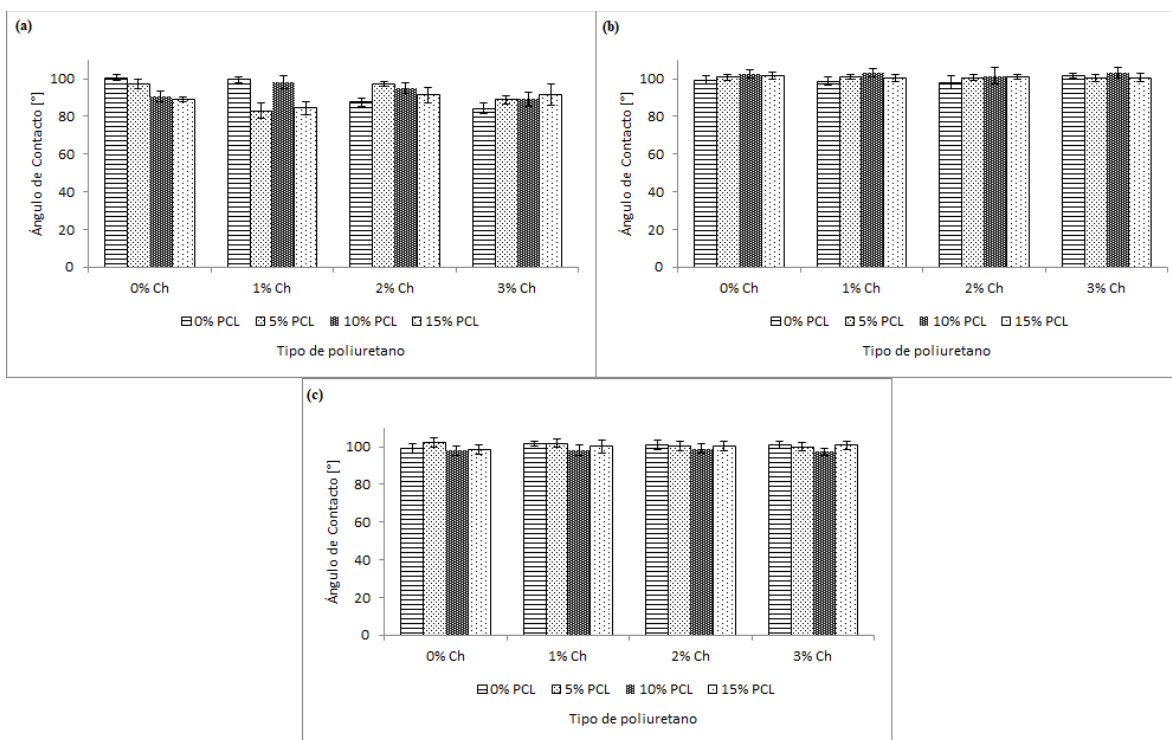


ANEXO 4. TEMPERATURA DE TRANSICIÓN VÍTREA DE PUs SINTETIZADOS CON IPDI

Material polimérico	T_g (°C)		
	P.1	P.2	P.3
0% PCL+0% Ch	-14,8	-12,8	14,8
0% PCL+1% Ch	-12,5	-11,3	12,3
0% PCL+2% Ch	-13,6	-9,8	16,6
0% PCL+3% Ch	-13,3	-1,0	13,7
5% PCL+0% Ch	-16,5	-6,7	5,4
5% PCL+1% Ch	-16,1	-10,2	8,5
5% PCL+2% Ch	-13,9	-3,7	8,6
5% PCL+3% Ch	-14,8	-5,4	9,2
10% PCL+0% Ch	-19,5	-11,4	3,4
10% PCL+1% Ch	-19,4	-12,7	2,8
10% PCL+2% Ch	-18,6	-10,2	5,6
10% PCL+3% Ch	-18,7	-12,2	7,2
15% PCL+0% Ch	-25,3	-10,2	4,7
15% PCL+1% Ch	-25,6	-14,3	1,6
15% PCL+2% Ch	-22,9	-15,4	3,6
15% PCL+3% Ch	-25,4	-14,8	2,8

Notas: P.1 corresponde al polirol sin modificar, P.2 es el polirol modificado con 1,32% mol de pentaeritritol/mol de aceite de higuera, y P.3 corresponde al polirol modificado con 2,64% mol de pentaeritritol/mol de aceite de higuera.

ANEXO 5. ÁNGULO DE CONTACTO DE PUs SINTETIZADOS CON IPDI



Notas: (a) materiales sintetizados con el poliol P.1, (b) materiales sintetizados con el poliol P.2, (c) materiales sintetizados con el poliol P.3. Los resultados de ángulo de contacto están dados como $\text{media} \pm \text{SD}$ ($n=10$).