



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Nuevos materiales compuestos polímero- cerámica para la regeneración y reparación ósea.**

**Clara Eugenia Plazas Bonilla**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Mecánica y Mecatrónica  
Bogotá, Colombia  
2014



# **Nuevos materiales compuestos polímero- cerámica para la regeneración y reparación ósea.**

**Clara Eugenia Plazas Bonilla**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Doctor en Ingeniería Ciencia y Tecnología de Materiales**

Director (a):

Ph.D., Ingeniero Químico Jairo Ernesto Perilla Perilla

Codirector (a):

Ph.D., Ingeniero Industrial José Luis Gómez Ribelles

Línea de Investigación:

Biomateriales

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos

Universidad Nacional de Colombia  
Ingeniería, Departamento de Ingeniería Mecánica y Mecatrónica  
Bogotá, Colombia  
2014



“Lo bueno, es enemigo de lo óptimo”.  
San Juan Bosco

A mis padres y a mis hermanos,  
por todo su apoyo y amor  
incondicional.

A mis hijas y a Fernando,  
por haber hecho parte de  
un inmenso esfuerzo  
para superar un gran reto.



## Agradecimientos

Quiero decir gracias Señor y Dios mío, mi guía permanente, ya que a pesar de tener que enfrentar muchos obstáculos en este camino, me inspiró y fortaleció para continuar por él.

Agradezco al Proyecto de Cooperación Internacional-COOPEN, por el apoyo económico para mi estancia en Valencia (España) con el fin de realizar la fase experimental del trabajo de la tesis y ofrecerme la oportunidad de vivir otra cultura y experiencias de vida.

Agradezco a la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), en especial al Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT) donde fueron realizados los ensayos experimentales contenidos en esta tesis y financiados dentro del proyecto MCINN-MAT2010-21611-C03-01 del Ministerio Español de Ciencia e Innovación. Así mismo agradezco el apoyo técnico brindado por el Centro de Microscopía de la UPV.

Agradezco a la Universidad Nacional, al programa de Ingeniería Ciencia y Tecnología de Materiales, del Departamento de Ingeniería Mecánica y Mecatrónica, de la Facultad de Ingeniería por acogerme en el programa para desarrollar mis estudios de doctorado.

Agradezco a mis directores, el profesor Jairo Perilla y el profesor José Luis Gómez Ribelles, por compartir conmigo su vasto conocimiento no solo científico, técnico y tecnológico sino práctico y de filosofía de vida. Gracias por ayudarme en la toma de decisiones importantes para el desarrollo del trabajo y apoyarme constantemente para la consecución de los objetivos propuestos.

Agradezco a mis amigos del CBIT, Jorge, Dunia, Tatiana, Carmen María, Carmen, Andrés, Laura, Myriam, José Antonio, Gloria, Roser, Ana, Amparo, Sara, Christos, Bermali, Marta, Johana, quienes además de ser mis amigos fueron un apoyo permanente en la fase experimental de mi trabajo.

Agradezco a los chicos de mi despacho: Silvia, Úrsula, Vicky, Alex, Alexander quienes con su juventud, optimismo y alegría aportaron un toque especial a mi estadía en el CBIT y me hicieron sentir su cariño y apoyo.

Finalmente, agradezco a todos aquellos que de una u otra forma me apoyaron durante la realización de mis estudios de doctorado y la ejecución del presente trabajo.

## Resumen

Se obtuvieron dos grupos de materiales compuestos polímero-sílice usando la técnica sol-gel *in situ*, los cuales fueron caracterizados en sus propiedades morfológicas y físicas.

Un primer grupo, incluye un material híbrido de poli (hidroxietil acrilato)-sílice en el cual se forman micro- y nano- partículas de sílice. Para su producción se usó un método con dos pasos: un primer paso implicó la síntesis de la red porosa del hidrogel por polimerización por radicales libres, usando cantidades variables de etanol; seguido de la absorción de una solución del precursor de sílice (Tetraetilortosilicato). Se obtuvieron así una serie de materiales compuestos con un contenido de sílice de hasta un ~60 % m/m. La sílice se presenta en forma de una fase continua, en donde una fracción se encuentra ocupando los poros mientras otra parte de ella forma nanopartículas dispersas en la red del polímero.

El segundo grupo de materiales compuestos obtenidos, consistió en un *composite* policaprolactona-sílice, logrado a partir de membranas porosas y *scaffolds* del polímero PCL. En este proceso, el primer paso fue la producción de membranas/*scaffolds* de PCL usando la técnica de extracción en congelación (*freeze extraction*). Como segundo paso, se introdujo la fase inorgánica en la estructura porosa de polímero, por medio de una reacción sol-gel vía catálisis ácida o básica; empleando una solución precursora de sílice (TEOS) y un sistema al vacío. En medio ácido, se obtuvo una capa uniforme de sílice que recubre las paredes de los poros de la membrana o del *scaffold* de la policaprolactona logrando un contenido de sílice de hasta un 60 % m/m; mientras que en el medio básico, la sílice fue producida como macropartículas dentro de los poros, obteniéndose un contenido de sílice mucho menor.

Para evaluar si los materiales compuestos presentaban un mejor desempeño mecánico y de bioactividad con relación al polímero puro y para conocer el efecto de la porosidad de los materiales poliméricos de partida; se evaluó la microestructura del *composite* obtenido y su relación con el catalizador empleado y el material polimérico de partida. Se caracterizaron las propiedades mecánicas, además de realizar pruebas de bioactividad *in vitro* y otros ensayos físicos.

**Palabras clave:** BIOMATERIALES, MATERIALES HÍBRIDOS, HÍBRIDOS POLÍMERO-SÍLICE, COMPUESTOS CON MATRIZ POLIMÉRICA, SOL-GEL, HÍBRIDOS, CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA, COMPOSITES.



## Abstract

Two groups of polymer matrix *composites* using an *in situ* sol-gel reaction were produced and characterized.

A first group of *composites* comprised a set of hybrids of poly (hydroxyethyl acrylate) and silica presented as micro- and nano-particles. For that, a two-step method production involved the porous hydrogel network synthesis by the radical polymerization using diverse amounts of ethanol, followed by the absorption of a silica precursor solution (Tetraethylorthosilicate). In that way *composites* with a content of silica up to ~60% by weight, in the form of a continuous phase with a fraction of the silica phase occupying the pores while another part was in the form of nanoparticles dispersed in the polymer phase, were obtained.

The second group of *composites* materials consisted of polycaprolactone-silica porous membranes and *scaffolds*. In that case, first step was the PCL membranes/*scaffolds* production by freeze extraction and the second step was the sol-gel synthesis via acid or base catalysis of the inorganic phase thru the use of a solution of silica precursor and a vacuum system for introducing it into the porous polymer matrix. In acidic medium, a uniform coating of the silica inside the polycaprolactone pore walls was obtained with silica content up to 60% m/m, whereas in basic medium, lower content of silica was produced in the form of micro particles inside the pores.

For assessing the better mechanical and bioactivity performance of the *composites* regarding the pure polymer, and aiming to judge the effect of porosity in agreement with the initial polymer matrix; it was evaluated the microstructure of the final material conferred as a result of the catalyst used and a characterization was made through the analysis of the mechanical properties, *in vitro* bioactivity tests and some other physical assays.

**Keywords: BIOMATERIALS, HYBRID COMPOSITE; POLYMER-SILICA HYBRIDS; POLYMER-MATRIX COMPOSITES (PMCs); SOL-GEL; HYBRID; PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERIZATION**

# Contenido

.....	<b>Pág.</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>IX</b>
<b>Contenido.....</b>	<b>X</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>XIII</b>
<b>Lista de Tablas .....</b>	<b>XVI</b>
<b>Lista de Ecuaciones/Reacciones .....</b>	<b>XVII</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas.....</b>	<b>XVIII</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO 1. Biomateriales poliméricos y <i>composites</i> polímero-sílice .....</b>	<b>31</b>
<b>1.1 Los hidrogeles.....</b>	<b>33</b>
1.1.1. El poli (hidroxietil acrilato) (PHEA) y los hidrogeles de poli (acrilato).....	33
1.1.2. El quitosano como ejemplo de hidrogeles naturales .....	34
1.1.3. Los materiales compuestos hidrogel-sílice.....	36
<b>1.2. La policaprolactona como polímero biodegradable y los materiales compuestos de policaprolactona-sílice .....</b>	<b>38</b>
<b>1.3. El óxido de silicio y su bioactividad.....</b>	<b>41</b>
<b>1.4. La reacción Sol-Gel como herramienta para obtener gel de sílice y producir materiales bioactivos.....</b>	<b>44</b>
<b>CAPÍTULO 2. Materiales y Métodos.....</b>	<b>49</b>
<b>2.1. Elaboración de films de PHEA y sus híbridos.....</b>	<b>49</b>
2.1.1. Materiales/ Equipos.....	49
2.1.2. Métodos.....	50
<b>2.2. Caracterización de hidrogeles de PHEA e híbridos PHEA-SÍLICE.....</b>	<b>51</b>
2.2.1. Composición de los híbridos .....	51
2.2.2. Absorción de agua /Porosidad.....	51
2.2.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	52
2.2.4. Microscopía de fuerza Atómica (AFM).....	53

2.2.5.	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) .....	53
2.2.6.	Análisis Térmico: Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Termogravimetría (TGA).....	53
2.2.7.	Ensayos Mecánicos .....	54
2.2.8.	Ensayo de Bioactividad.....	54
<b>2.3.</b>	<b>Elaboración de membranas y <i>scaffolds</i> de PCL y sus <i>composites</i> .....</b>	<b>55</b>
2.3.1.	Materiales/ Equipos.....	55
2.3.2.	Métodos.....	56
<b>2.4.</b>	<b>Caracterización de las membranas y <i>scaffolds</i> de PCL y sus <i>composites</i> PCL-SÍLICE obtenidos.....</b>	<b>61</b>
2.4.1.	Porosidad de las membranas (y <i>scaffolds</i> ) de PCL y de los híbridos.....	61
2.4.2.	Composición del híbrido en fase inorgánica .....	62
2.4.3.	Propiedades hidrofílicas: Absorción de agua y ángulo de contacto .....	62
2.4.4.	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	62
2.4.5.	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) .....	62
2.4.6.	Análisis Térmico: Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Termogravimetría (TGA).....	63
2.4.7.	Ensayos Mecánicos .....	63
2.4.8.	Ensayo de Bioactividad.....	64
<b>CAPÍTULO 3. Resultados y Discusión de Resultados .....</b>		<b>65</b>
<b>3.1</b>	<b>Obtención de membranas de PHEA con diversas porosidades y de híbridos PHEA-SÍLICE.....</b>	<b>65</b>
<b>3.2.</b>	<b>Síntesis <i>in situ</i> de la fase de sílice en los hidrogeles previamente sintetizados .....</b>	<b>68</b>
<b>3.3.</b>	<b>Caracterización de las membranas de PHEA y de sus híbridos .....</b>	<b>70</b>
3.3.1.	Absorción de agua /Porosidad.....	70
3.3.2.	Síntesis de la fase inorgánica, contenido de sílice obtenido y su efecto en la absorción de agua .....	71
3.3.3.	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) .....	74
3.3.4.	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier.....	76
3.3.5.	Caracterización Térmica (TGA, DSC y DMTA) .....	79
3.3.6.	Ensayos Mecánicos .....	86
3.3.7.	Ensayo de Bioactividad.....	89
<b>3.4.</b>	<b>Caracterización de membranas y <i>scaffolds</i> de PCL y de sus <i>composites</i> PCL-sílice obtenidos por catálisis ácida y/o básica .....</b>	<b>91</b>
3.4.1.	Porosidad de las membranas y <i>scaffolds</i> de PCL.....	91
3.4.2.	Microestructura y composición de los <i>composites</i> en fase inorgánica.....	93
3.4.3.	Propiedades hidrofílicas: Absorción de agua y ángulo de contacto .....	100
3.4.4.	Propiedades Térmicas: Calorimetría Diferencial de Barrido, (DSC) y Termogravimetría (TGA).....	100
3.4.5.	Ensayos Mecánicos .....	103
3.4.6.	Ensayo de Bioactividad.....	108
<b>CAPÍTULO 4. Conclusiones y Recomendaciones.....</b>		<b>113</b>
<b>4.1.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>113</b>

---

4.1.1	En relación con la técnica sol-gel.....	113
4.1.2.	En relación con los híbridos PHEA-SiO <sub>2</sub> .....	114
4.1.3.	En relación con los composites PCL-SiO <sub>2</sub> .....	116
4.1.4.	Con relación al estudio con células .....	118
<b>4.2.</b>	<b>Recomendaciones .....</b>	<b>118</b>
<b>A.</b>	<b>Anexo: Selección de las condiciones para realizar la reacción Sol-Gel .....</b>	<b>121</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>127</b>

## Lista de Figuras

Figura 1 (a) Fórmula estructural del 2-hidroxietil acrilato. (b) Estructura de la quitina y el quitosano.....	34
Figura 2 Mecanismo propuesto para la formación de apatita cristalina cuando la sílice entra en contacto con SBF. Inspirado en Vallés Lluch, 2008 (Vallés 2008).....	48
Figura 3 Proceso para la preparación de membranas y de <i>scaffolds</i> de PCL (incorporación de porógeno), por el método <i>freeze extraction</i> . .....	57
Figura 4 Sistema al vacío usado para la introducción de solución de TEOS en las membranas/ <i>scaffolds</i> de PCL. ....	59
Figura 5 Representación de la estructura obtenida por micro y macrosinéresis.....	66
Figura 6 Apariencia física del híbrido PHEA20SI. ....	68
Figura 7 Absorción de agua de las membranas de PHEA con su desviación estándar relativa (DSR) para las diversas porosidades. ....	71
Figura 8 Efecto de la presencia de sílice en la absorción de agua de las membranas de PHEA.....	73
Figura 9 La absorción de agua en función del contenido de sílice en los materiales híbridos PHEA-SILICE.....	73
Figura 10 Microfotografías en SEM del hidrogel PHEA50 y el correspondiente híbrido PHEA50SI. Tomada y traducida del original en Plazas <i>et al.</i> 2013.....	74
Figura 11 Espectro EDS tomado en superficie de una muestra de híbrido PHEA-SILICE. En inserto: Reporte del porcentaje en peso y atómico de los elementos presentes de una muestra y valor teórico para el óxido de silicio. ....	75
Figura 12 Imágenes AFM en amplitud de secciones transversales de materiales híbridos. Área de barrido Figura a) : 2 $\mu\text{m}$ x 2 $\mu\text{m}$ de PHEA0SI. Área de barrido Figura b): 10 $\mu\text{m}$ x 10 $\mu\text{m}$ de PHEA50SI. Tomada y traducida del original en Plazas <i>et al.</i> 2013..	76
Figura 13 Espectros FTIR - ATR a)Para los films de los hidrogeles de diversas porosidades, b) Para los híbridos PHEA0SI y PHEA30SI. c) Para el hidrogel de PHEA en comparación con el FTIR-SDR del híbrido PHEA50SI . Los espectros han sido desplazados en el eje Y para facilitar su entendimiento. Tomada y traducida del original en Plazas <i>et al.</i> 2013.....	78
Figura 14 Curvas típicas de degradación térmica (TGA) para un hidrogel de PHEA. ....	79
Figura 15 Curva de degradación térmica (TGA) para los materiales híbridos PHEA-SILICE.....	80

Figura 16 Curvas de degradación para el hidrogel PHEA50 y su correspondiente híbrido PHEA50SI. ....	80
Figura 17 Termogramas de calentamiento en DSC para PHEA0 y PHEA0SI secos. ....	82
Figura 18 Termogramas de DSC comparativo de muestras de hidrogel puro de PHEA hidratadas. ....	83
Figura 19 Curva de calentamiento en DSC: Flujo de calor para la cristalización de muestras de híbridos PHEA-SILICE hidratadas. ....	85
Figura 20 Efecto de la temperatura en el módulo de almacenamiento ( $E'$ ) de la muestra PHEA0SI sometida a un barrido de calentamiento a 1Hz, entre 25 y 120°C seguido de un enfriamiento de 120 a 25°C. Tomada y traducida del original en Plazas <i>et al.</i> 2013. ....	86
Figura 21 Valores de la Compliance ( $m^2/N$ ) para los hidrogeles puros de PHEA y los híbridos PHEA-SILICE. ....	88
Figura 22 Microfotografías de SEM de PHEA30 (a) y de PHEA30-Si (b) después de dos semanas de inmersión en SBF. La dimensión de la barra corresponde a 20 $\mu m$ . Tomada y traducida del original en Plazas <i>et al.</i> 2013. ....	90
Figura 23 Porosidad de las membranas de PCL preparadas con soluciones de diversos porcentajes de polímero en dioxano. ....	92
Figura 24 Microfotografías de SEM de las secciones transversales de membranas de PCL pura: (a) PCL05, (b) PCL10, (c) PCL15 y (d) PCL20. Tomada y traducida del original en Plazas <i>et al.</i> 2014. ....	93
Figura 25 Microfotografías SEM de la sección transversal de (a) PCL15SIA, (b) PCL15SIB. En (c) y (d) se presenta aumento de (a) y (b) respectivamente. Mapeo de silicio por análisis EDS de (e) la superficie PCL15SIA y de (f) la sección transversal PCL15SIA (g) Sección transversal de PCL10C1G65T21 (h) Aumento de (g). Adaptada y traducida de los originales en Plazas <i>et al.</i> 2014 y en Trujillo <i>et al.</i> 2014. ....	96
Figura 26 Imágenes SEM de la sección transversal de PCL5SIA (a) Antes y (b) Después de la pirolisis. Tomada y traducida del original en Plazas <i>et al.</i> 2014. ....	97
Figura 27 Espectros FTIR de la película de PCL10 y los correspondientes composites PCL10SIA y PCL10SIB. Los espectros se desplazan en el eje Y para mayor claridad. ....	98
Figura 28 Termogramas de TGA de la membrana de PCL 10 y los composites obtenidos por catálisis en medio ácido ( PCLSIA ) y en medio básico (PCL SIB). ....	101
Figura 29 Termograma DSC de calentamiento para la membrana de PCL10 y para los materiales compuestos producidos por reacciones sol-gel catalizadas por ácido y base. Adaptada y traducida del original en Plazas <i>et al.</i> 2014. ....	103
Figura 30 Efecto de la temperatura en el módulo de almacenamiento ( $E'$ ) y en la Tangente delta de la membrana de PCL15 y de los composites catalizadas por ácido y por base. Tomada y traducida del original en Plazas <i>et al.</i> 2014. ....	104

- Figura 31 Curvas de carga-penetración resultantes de los ensayos de indentación en TMA para (a) PCL10, PCL10SIA y PCL10SIB (b) Influencia de la porosidad de la membrana PCL de partida en la rigidez de los composites. Tomada y traducida del original en Plazas *et al.* 2014..... 106
- Figura 32 Curvas Esfuerzo- Deformación realizadas en equipo Microtester, para la membrana de PCL10 y los correspondientes materiales compuestos catalizados con ácido (PCL10SIA) y con base (PCL10SIB). Tomada y traducida del original en Plazas *et al.* 2014. .... 107
- Figura 33 Microfotografías de SEM de superficies de a) Membrana PCL15, b) PCL15SIA, después de tres semanas, c) Membrana PCL15 y d) PCL15SIB, después de dos semanas en SBF. La dimensión de la barra corresponde a 10  $\mu\text{m}$  en todas las microfotografías. Tomada y traducida del original en Plazas *et al.* 2014. .... 109
- Figura 34 Microfotografías de SEM de cortes transversales de a) Membrana PCL15, b) PCL15SIA, después de tres semanas, de inmersión en SBF c) Membrana PCL15 y d) PCL15SIB, después de dos semanas en SBF. La barra corresponde a 10  $\mu\text{m}$ . .... 110

## Lista de Tablas

Tabla 1. Relaciones molares usadas para preparar membranas de PCL con quitosano, GPTMS y sílice, según lo reportado por Mahony <i>et al.</i> 2010 (Mahony <i>et al.</i> 2010, Trujillo 2012, Trujillo <i>et al.</i> 2014). .....	60
Tabla 2. Propiedades físicas de los hidrogeles de PHEA puros y sus híbridos con sílice. .	69
Tabla 3. Valores de Tg y Delta de la capacidad calorífica a la Tg de los hidrogeles de PHEA y sus materiales híbridos obtenidos.....	81
Tabla 4. Contenido de agua disponible para cristalizar en hidrogeles de PHEA e híbridos	84
Tabla 5. Resultados del ensayo de Bioactividad después de dos semanas de inmersión en SBF. Tomada y traducida del original en Plazas <i>et al.</i> 2013.....	91
Tabla 6. Concentración de las soluciones PCL utilizados para preparar las membranas de PCL y los materiales compuestos correspondientes. Codificación de muestras y contenido de sílice en catálisis ácida y básica. Adaptada y traducida del original en Plazas <i>et al.</i> 2014. ....	94
Tabla 7. Algunas propiedades físicas de la membrana PCL10, el <i>scaffold</i> de PCL y sus materiales compuestos. ....	99
Tabla 8. Variaciones de peso de los composites obtenidos en medio ácido en comparación con el control durante la inmersión en SBF. ....	109



## Lista de Ecuaciones/Reacciones

Ecuación 1 Hidrólisis de tetraetil ortosilicato (TEOS). .....	51
Ecuación 2 Condensación de grupos SiOH para formar la red de sílice .....	51
Ecuación 3 Formación de silicato de calcio amorfo – sin cargas .....	51
Ecuación 4 Formación de silicato de calcio amorfo – con carga positiva .....	517
Ecuación 5 Formación de silicato de calcio amorfo – con dos cargas positivas .....	51
Ecuación 6, 7 Cambios en la solución SBF por la presencia de vidrios bioactivos con calcio .....	51
Ecuación 8 Cálculo de la porosidad en un hidrogel hidratado.....	52
Ecuación 9 Cálculo del volumen específico del hidrogel microporoso hidratado.....	52
Ecuación 10 Cálculo de la porosidad de una membrana por absorción de solvente.....	61
Ecuación 11 Cálculo del volumen de poros de una membrana polimérica porosa .....	61
Ecuación 12 Cálculo del volumen ocupado por el polímero en una membrana porosa ....	61
Ecuación 13 Cálculo del volumen ocupado por el material compuesto o híbrido .....	61
Ecuación 14 Cálculo de la porosidad de una membrana por absorción de solvente .....	62
Ecuación 15 Relación Fuerza – Penetración para un ensayo de indentación. ....	87
Ecuación 16 Cálculo de la <i>Compliance</i> a partir de una curva Carga – Penetración .....	87

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Símbolos con letras latinas

<b>Símbolo</b>	<b>Término</b>	<b>Unidad</b>	<b>Definición</b>
$a$	<i>Radio del indentador</i>	mm	<i>Ecuación 15</i>
$C_p$	<i>Capacidad calorífica</i>	(J/K <sup>-1</sup> )	<i>Tabla 3</i>
$dP/dt$	<i>Velocidad de carga</i>	N/minuto	<i>Ecuación 16</i>
$dw/dt$	<i>Velocidad de penetración</i>		<i>Ecuación 16</i>
EWC	<i>Contenido de agua en equilibrio</i>	% m/m o fracción	<i>Absorción de agua /Porosidad</i>
$E'$	<i>Módulo de almacenamiento</i>	Pascal	<i>Figura 20</i>
$E''$	<i>Módulo de pérdida</i>	Pascal	<i>Figura 30</i>
$h$	<i>Espesor del material</i>	mm	<i>Ecuación 15- Ecuación 16</i>
$J_{(t)}$	<i>Compliance</i>	m <sup>2</sup> /N	<i>Ecuación 16</i>
$t$	<i>tiempo</i>	s, min, horas	<i>Ecuación 16</i>
$T_g$	<i>Temperatura de transición vítrea</i>	°C	<i>Tabla 3</i>
$W_m$	<i>Peso de muestra</i>	mg, g	

$V_{sp}$	Volumen de material polimérico hidratado	$cm^3$	Ecuación 8
$V_{poros}$	Volumen de poros	$cm^3$	Ecuación 10- Ecuación 11
$V_{polímero/}$ $membrana$	Volumen de material polimérico, híbrido o composite	$cm^3$	Ecuación 10- Ecuación 12- Ecuación 13
WB	Fracción de masa de agua en muestra no porosa	-----	Ecuación 9
Wm	Peso de muestra	mg, g	
% m/m	Porcentaje peso a peso	%	

**Símbolos con letras griegas**

Símbolo	Término	Unidad	Definición
$\Delta C_p(T_g)/W_{muestra}$	Delta de Capacidad calorífica normalizado al peso de muestra o de polímero a la temperatura de transición vítrea	$Jg^{-1} K^{-1}$	Tabla 3
$\kappa$	Parámetro adimensional, depende de la relación a/h y del coeficiente de Poisson	-----	Ecuación 15 Ecuación 16
$\phi$	Porosidad	%	Ecuación 10 Ecuación 14
$\nu$	Volumen específico	$cm^3 g^{-1}$	Ecuación 8 Ecuación 9
$\omega$	Agua absorbida por la muestra porosa	% m/m o fracción adimensional	Ecuación 8
$\omega_B$	Agua absorbida por la muestra microporosa	% m/m o fracción adimensional	Ecuación 8
$W_{seco}$	Peso seco del material	g	Ecuación 11 Ecuación 12 Ecuación 13 Ecuación 14

<b>Símbolo</b>	<b>Término</b>	<b>Unidad</b>	<b>Definición</b>
$W_{\text{húmedo}}$	<i>Peso húmedo del material ( con agua purificada o solvente)</i>	g	<i>Ecuación 11 y 14</i>
$\rho_x$	<i>Densidad de un líquido o material x</i>	g / cm <sup>3</sup>	<i>Ecuación 11 Ecuación 12 Ecuación 13 Ecuación 14</i>
$\nu$	<i>Coficiente de Poisson</i>	Adimensional	<i>Ecuación 16</i>

### Subíndices / Términos con Subíndices

<b>Subíndice</b>	<b>Término</b>
sp	<i>Polímero hidratado</i>

### Unidades usadas

<b>Expresión</b>	<b>Definición</b>	<b>Aplicación</b>
°C	<i>Grados Celsius</i>	-----
°C/min	<i>Velocidad de calentamiento</i>	<i>Termogramas DSC- TGA</i>
cm <sup>-1</sup>	<i>Unidad de número de onda</i>	<i>Espectros FTIR</i>
kD	<i>kilodalton</i>	<i>Unidades de Peso Molecular</i>
kV , V	<i>Kilovoltios / voltios</i>	<i>Potencial eléctrico</i>
kHz	<i>Kilohertzios</i>	<i>Frecuencia de resonancia</i>
°K	<i>Grados Kelvin</i>	-----
mM	<i>milimolar</i>	<i>Milimoles por mililitro</i>
ppm	<i>Partes por millón</i>	<i>mg/g ; mg/litro</i>
W/g, mW/mg	<i>Watts/gramo, miliWatts/miligramo</i>	<i>Termogramas DSC</i>

### Abreviaturas /Fórmulas Químicas

## Abreviatura correspondiente a

**MATERIAL/ELEMENTO/  
CELULAS/COMPUESTO O SOLUCION****Término**

<b>BHT</b>	<i>Butihidroxitolueno</i>
<b>BIOGLASS</b>	<i>Vidrio bioactivo</i>
<b>CH<sub>3</sub>COOH</b>	<i>Ácido Acético</i>
<b>CaO</b>	<i>Oxido de Calcio</i>
<b>EGDMA</b>	<i>Etilenglicol dimetilacrilato</i>
<b>Elvacite</b>	<i>Mezcla PEMA Y PMMA</i>
<b>GAGs</b>	<i>Glicosaminoglicanos</i>
<b>GPTMS</b>	<i>3-glicidiloxipropiltrimetoxisilano</i>
<b>HAp</b>	<i>Hidroxiapatita</i>
<b>HCl</b>	<i>Ácido clorhídrico</i>
<b>HEA</b>	<i>2-Hidroxietyl acrilato</i>
<b>HEMA</b>	<i>Hidroxiethylmetacrilato</i>
<b>IPN</b>	<i>Redes interpenetradas</i>
<b>MSCs</b>	<i>Células Madre Mesenquimales</i>
<b>Na<sub>2</sub>O</b>	<i>Oxido de Sodio</i>
<b>NH<sub>4</sub>OH</b>	<i>Amonio Hidróxido</i>
<b>PAA</b>	<i>Ácido poliacrílico</i>
<b>PCL</b>	<i>Policaprolactona</i>
<b>PGA</b>	<i>Ácido Poliglicólico</i>
<b>PEMA</b>	<i>Polietilmetacrilato</i>
<b>PHEA</b>	<i>Polihidroxietyl acrilato</i>
<b>PHEMA</b>	<i>Polihidroxiethylmetacrilato</i>
<b>PLLA</b>	<i>Ácido Poli L-láctico</i>
<b>PLGA</b>	<i>Poli[d,l-(láctido-co-glicólido)]</i>
<b>PMMA</b>	<i>Polimetilmetacrilato</i>
<b>PTFE</b>	<i>Politetrafluoroetileno</i>
<b>PVA</b>	<i>Polivinil alcohol</i>
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	<i>Pentóxido de Fósforo</i>
<b>SBF</b>	<i>Fluido Corporal Simulado</i>
<b>SiO<sub>2</sub></b>	<i>Oxido de Silicio/ Sílice</i>
<b>TCP</b>	<i>Tricalciofosfato</i>
<b>TEOS</b>	<i>Tetraethylortosilicato /Tetraethylortosilano/Tetraetoxisilano</i>

**TECNICAS ANALÍTICAS****AFM***Microscopía de Fuerza Atómica*

**Abreviatura correspondiente a*****MATERIAL/ELEMENTO/  
CELULAS/COMPUESTO O SOLUCION*****Término**

<b>DMTA</b>	<i>Análisis dinámico termomecánico</i>
<b>DSC</b>	<i>Calorimetría Diferencial de Barrido</i>
<b>EDS</b>	<i>Espectroscopia de Dispersión de Rayos X</i>
<b>FTIR</b>	<i>Infrarrojo con Transformada de Fourier</i>
<b>ATR</b>	<i>Reflectancia Total Atenuada</i>
<b>IR</b>	<i>Infrarrojo</i>
<b>SDR</b>	<i>Reflectancia Difusa</i>
<b>SEM</b>	<i>Microscopía Electrónica de Barrido</i>
<b>TEM</b>	<i>Microscopía Electrónica de Transmisión</i>
<b>TGA</b>	<i>Análisis Termogravimétrico</i>
<b>TMA</b>	<i>Análisis Termomecánico</i>

***ENTES NACIONALES E  
INTERNACIONALES*****FDA***Food and Drug Administration***Términos*****Material híbrido***

Material compuesto de una mezcla íntima de componentes inorgánicos, componentes orgánicos o de ambas naturalezas.

Nota: Los componentes usualmente interpenetran a escalas menores a 1 micrómetro (1  $\mu\text{m}$ ) (McNaught 2007).

***Material híbrido químicamente unido***

Material híbrido en el cual los componentes están unidos uno al otro por enlaces covalentes o parcialmente covalente (McNaught 2007).

***Composite***

Material con múltiples componentes que comprende múltiples o diferentes fases (no-gaseosas) en el cual al menos uno de las dos fases es una fase continua (McNaught 2007).

***Microgel***

Es una partícula de gel de cualquier forma con un diámetro equivalente de aproximadamente de 0.1–100  $\mu\text{m}$ .

También ha sido históricamente referido como polímeros altamente cruzados presentes cerca al punto de gelificación durante la formación de una red ( Elbert 2011).

***Nanogel***

Es un partícula de gel de cualquier forma con un diámetro equivalente de aproximadamente de 1–100 nm. (Elbert 2011).

***Biomateriales macroporosos***

Poseen tamaños de poro mayores a 1  $\mu\text{m}$  (Elbert 2011).

***Biomateriales microporosos***

Poseen tamaños de poro entre 100 nm y 1  $\mu\text{m}$  (Elbert 2011).

***Biomateriales nanoporosos***

Poseen tamaños de poro menores de 100 nm (Elbert 2011).





## Introducción

Cuando se presentan lesiones a nivel del hueso y las articulaciones, se puede llegar a requerir el uso de fijaciones externas o internas para el tejido óseo, o puede ser necesario su reemplazo parcial o total. El diseño de un material que pueda ser útil en este tipo de eventos es una actividad científica e investigativa que debe ser abordada desde la Ciencia y Tecnología de los Materiales. Para ello es necesario explorar los requerimientos del tejido y por tanto las propiedades demandadas para lograr su reemplazo o regeneración. Estas aplicaciones específicas dirigen la atención hacia un grupo específico de materiales: los biomateriales.

Inicialmente se debe estudiar el proceso regenerativo del tejido en cuestión. En principio podría pensarse que estos materiales deben ser inertes, pero cuando se analiza más profundamente este concepto se llega a concluir que evidentemente deben conllevar a una respuesta biológica favorable tanto a nivel local como sistémico.

La primera aproximación al tema es la selección de la naturaleza del material. Si se selecciona un biomaterial metálico, debe reconocerse sus debilidades desde el punto de vista biológico, quedando opciones interesantes con los materiales cerámicos y poliméricos; los que a su vez presentan desventajas pero que han demostrado respectivamente propiedades biológicas y mecánicas interesantes, las cuales pueden combinarse en la obtención de materiales compuestos que cumplan los requisitos enmarcados en el contexto de la aplicación y del tejido a regenerar o reemplazar; en este caso, el óseo.

Es importante, discernir si la aplicación del biomaterial está dirigida a realizar un reemplazo (caso para el cual se puede requerir una permanencia duradera del material en el organismo) o un ajuste y pensar por tanto en las necesidades que pueden presentarse en función de la degradabilidad del biomaterial. Cuando no se requiere que el material cuente con propiedades de biodegradabilidad, se contempla la opción de estudiar un material reconocido por su biocompatibilidad, en donde los hidrogeles se constituyen en una muy buena opción. Sin embargo surge la pregunta respecto de cómo mejorar sus propiedades físicas y su respuesta biológica.

Por otra parte, cuando el propósito previsto como es el de esta investigación contempla el relacionado con el tejido óseo; se debe identificar que la biodegradabilidad que presentan algunos polímeros, puede constituirse en una ventaja particularmente decisiva. El hecho de

que ocurra una transmisión paulatina de esfuerzos a las áreas lesionadas o al tejido en recuperación, evita una segunda intervención quirúrgica para la remoción del material y esto es una ventaja para el paciente tanto en calidad de vida como desde el punto de vista económico.

Entre los materiales biodegradables, la Policaprolactona (PCL) resulta ser un polímero bastante adecuado para desarrollar el presente estudio, por sus buenas propiedades mecánicas, buena biocompatibilidad y por la ventaja de contar con la aprobación para ser usada en materiales implantables por parte de la FDA (Food and Drug Administration) y otros entes regulatorios internacionales; pero que presenta como desventaja su baja hidrofiliidad.

Sin embargo, dado que los polímeros sintéticos presentan como característica limitante la falta de capacidad de promover adhesión celular, proliferación y recuperación del tejido; se requiere conferir esta propiedad a través del uso de sílice en materiales compuestos, en donde se combinan las ventajas de cada uno de los materiales que lo constituyen.

Un desafío importante para el diseño del materiales es que se adhieran al tejido óseo; propiedad denominada “bioactividad”. Esto podría ocurrir por ejemplo si el material logra ligarse al hueso a través de una capa de hidroxiapatita. Por esta razón fue que se planteó que en una primera aproximación al desempeño biológico del material debería realizarse ensayos *in vitro* que simularan la formación o deposición de la capa de hidroxiapatita.

Al considerar las propiedades superficiales, como elementos que controlan la respuesta biológica del material, es importante la selección de una tecnología que permitiera la deposición de especies inorgánicas, y es así como surge la opción de usar la tecnología de las reacciones sol-gel.

Resulta significativo de igual forma, reconocer que la respuesta de un material al ser implantado en el organismo y estar en contacto directo con el tejido óseo debe integrarse a este ambiente sin promover la formación de una capa de naturaleza fibrosa en la interfase. Esta característica se relaciona con la bioactividad ya que los fibroblastos proliferan, se diferencian a osteoblastos y producen matriz extracelular en la capa de hidroxiapatita.

Es por ello que al consolidar los requerimientos que deben cumplir los biomateriales para regeneración de tejido óseo; se identifica que además de ser bioactivos y mecánicamente compatibles con el tejido natural en donde se implantan; deben ser osteogénicos, lo que conlleva a la necesidad de que sean osteoinductivos y osteoconductivos.

Como estrategia para obtener un material que cumpliera con las demandas necesarias; en el presente trabajo, se partió de la experiencia previa del grupo del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT) en el estudio de polímeros visualizados como materiales para regeneración y reparación del tejido óseo. Siguiendo la tendencia en el manejo de materiales reconocidos por su biocompatibilidad y/o por su biodegradabilidad; se presenta entonces la experimentación realizada para el diseño y fabricación de materiales compuestos polímero-sílice a partir de membranas de Polihidroxietil acrilato (PHEA) micro y macroporoso, y de PCL en forma de membranas con porosidades variables y de

un *scaffold* de porosidad conocida. La introducción de la fase inorgánica *in situ* en estas estructuras poliméricas se enfocó en tomar ventaja de la capacidad de absorción de fases acuosas por parte del polímero tipo hidrogel; y en la forma para contrarrestar la hidrofobicidad, una propiedad inherente que a la vez se suele considerar como una desventaja de la PCL; se trata de la aplicación de condiciones de vacío y el uso de una solución precursora de sílice con etanol y la catálisis de la reacción en medio ácido y básico, para el caso de las membranas y *scaffolds* de PCL.

La caracterización se realizó con base en la infraestructura y recursos disponibles en el CBIT. Se evaluó para cada material obtenido, la influencia de la presencia de la fase inorgánica en las propiedades físicas especialmente mecánicas, que permitieran inferir el mejoramiento de características que les haga útiles en el campo de la regeneración ósea. A través del ensayo de bioactividad *in vitro*, se evaluó una característica que permite inferir otras propiedades que impactan finalmente en la osteoregeneración, la osteointegración, la osteoconducción y por ende en contexto, en su bioactividad.

Si bien no fueron evaluadas propiedades *in vivo*, se realizaron una serie de experimentos con cultivo de células (*in vitro*), efectuadas por Bermali Demirdögen quien se encontraba vinculada con el Laboratorio TEBN, Stem Cell Institute de Ankara, Turquía; como parte del convenio de colaboración con la Universidad de Ankara. Igualmente los ensayos con cultivo de células hicieron parte del trabajo de fin de carrera en Biotecnología, de Sara Trujillo de la Universidad Politécnica de Valencia (Trujillo 2012, Trujillo *et al.* 2014). Estos ensayos se constituyen en una base para el direccionamiento de nuevos estudios que mejoren las propiedades encontradas y que proyecten la realización de ensayos *in vivo* para la consecución de materiales promisorios en el campo de la ingeniería tisular en el reemplazo o regeneración de tejido óseo.

Para el desarrollo del presente trabajo se había planteado en una propuesta inicial los siguientes objetivos:

Como Objetivo General:

Diseñar y obtener un biomaterial compuesto polímero - cerámica con potencial aplicación en la elaboración de implantes biodegradables o bioestables para la regeneración o la reparación ósea, y evaluar comparativamente su funcionalidad física y biológica.

Como objetivos específicos, los siguientes:

- Proponer y estandarizar un proceso de obtención de un material biodegradable compuesto polímero / cerámica o con recubrimiento cerámico con potencial aplicación para la regeneración ósea.
- Desarrollar con el polímero, andamiajes macroporosos con superficies bioactivas de cara a mejorar su bioactividad.
- Caracterizar mediante modelos *in vitro* la bioactividad del recubrimiento superficial.

- Caracterizar las propiedades físicas (morfología de fases, absorción y difusión de agua, propiedades térmicas, propiedades de superficie) y mecánicas del material compuesto para desafiar su estabilidad mecánica frente a cargas de tensión, compresión y fractura con el fin de inferir su desempeño y durabilidad *in vivo* al ser implantado.
- Estudiar la respuesta biológica mediante modelos *in vitro*.

Por otra parte, la hipótesis inicial de trabajo fue: La presencia en la superficie de un material polimérico de partículas de apatita o vidrios bioactivos obtenidas por técnicas de recubrimiento, induce y acelera el crecimiento de tejido óseo cuando este material se implanta para la regeneración o reparación ósea.

El desarrollo del trabajo que se bosquejó con el fin de responder a los objetivos e hipótesis planteada se presenta en el presente documento, el cual se encuentra dividido en cuatro grandes capítulos: En un primer capítulo se incluye la información básica relacionada con los materiales poliméricos, profundizando en los hidrogeles usados en la investigación y en la policaprolactona, como polímero biodegradable. Para cada uno de estos materiales se plantea la experiencia relacionada con su uso en la obtención de materiales compuestos. De igual forma, se ha incluido la conceptualización de la reacciones sol-gel y los planteamientos que permiten producir a través de esta técnica materiales bioactivos. En un segundo capítulo, se han desarrollado los métodos y materiales usados en la fase experimental para la obtención de los dos grandes grupos de materiales: por una parte, las membranas porosas de PHEA y sus híbridos; y por la otra, las membranas/ *scaffolds* porosos de PCL y sus *composites*. En este capítulo se identifica la forma en que se aplica la reacción sol-gel *in situ*, en cada caso y se describen los métodos y técnicas de caracterización usadas en cada caso, y los detalles de su realización. El tercer capítulo, abarca la discusión de los resultados obtenidos, separando en dos subcapítulos para así tratar las particularidades de cada grupo de materiales compuestos. Se abordan de esta forma los diversos ensayos de caracterización efectuados en cada caso. Las conclusiones y recomendaciones se plantean en el capítulo cuatro, dividiendo en dos subcapítulos conclusiones relacionadas con cada uno de los grupos de materiales compuestos obtenidos. Las recomendaciones sin embargo, se establecen de forma general. Para finalizar, se documenta la bibliografía citada en el texto y se incluye un anexo que bosqueja como se obtuvo la relación de reactantes para aplicar las reacciones sol-gel a las matrices poliméricas.

Como productos del desarrollo de la presente investigación se tienen los siguientes artículos aceptados para publicación o publicados:

- B. Demirdögen, C.E. Plazas Bonilla, S. Trujillo, J.E. Perilla, A. E. Elcin, Y. M.Elcin, J.L. Gómez Ribelles, ***Silica coating of the pore walls of a micro porous polycaprolactone membrane to be used in bone tissue engineering***, Journal of Biomedical Materials Research A, Journal doi: 10.1002/jbma34999 (Demirdögen *et al.* 2013).

- Clara E. Plazas Bonilla , José A. Gómez-Tejedor , Jairo E. Perilla , José L. Gómez Ribelles, ***Silica phase formed by sol–gel reaction in the nano- and micro-pores of a polymer hydrogel***, Journal of Non-Crystalline Solids, 379 (2013) pp. 12–20 (Plazas *et al.* 2013).
- Clara E. Plazas Bonilla, Sara Trujillo, Bermali Demirdögen, Jairo E. Perilla, Y. Murat Elcin, José L. Gómez Ribelles, ***New porous polycaprolactone–silica composites for bone regeneration***, Materials Science and Engineering C, In Press, Available online 18 April 2014, In Progress, **40**(0), pp. 418-426 ( Plazas *et al.* 2014)
- Sara Trujillo, Clara E. Plazas Bonilla, Marta S. Santos, Joana M. Matos, Tatiana Gamboa, Jairo E. Perilla, João F. Mano and José L. Gómez Ribelles, ***Polycaprolactone membranes reinforced by toughened sol-gel produced silica networks***, Journal of Sol Gel Science and Technology, Journaldoi : 10.1007/s10971-014-3342-4 ( Trujillo *et al.* 2014).

De igual manera fueron presentados trabajos en los siguientes eventos científicos:

- Third Termis World Congress 2012, Viena Austria, Septiembre 2012, publicado en las memorias Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Vol 6 suplemento 1, 2012. Poster: ***Nanoreinforced polyhydroxyethyl acrylate hydrogels***, C.E. Plazas Bonilla, J.A. Gómez-Tejedor, J.E. Perilla, J.L. Gómez Ribelles.
- Sol-Gel 2013, International Sol-Gel Conference, Madrid, España, Agosto de 2013. Poster: ***PCL supports reinforced by toughened sol-gel produced silica networks***, S. Trujillo, C. E. Plazas Bonilla, M. S. Santos, J. M. Matos, J. E. Perilla, J.F. Mano and J.L. Gómez Ribelles.



# **CAPÍTULO 1. Biomateriales poliméricos y *composites* polímero-sílice**

Los biomateriales han llegado a ocupar un papel relevante en la salud humana pues pueden desempeñar o cumplir funciones en el diagnóstico, el tratamiento o el reemplazo de tejidos u órganos del cuerpo humano. Se diseñan y fabrican con el propósito de que actúen en la interfase con sistemas biológicos.

Los de origen metálico, presentan como desventaja que su respuesta se suele relacionar con un aflojamiento del implante, y aun en algunos casos han llegado a producir carcinogénesis (Ratner *et al.* 2012).

Los biomateriales de naturaleza polimérica y los cerámicos; por su parte pueden causar respuestas inflamatorias no específicas y resorción de la médula ósea (Villa *et al.* 2008). En forma específica algunas cerámicas tales como la hidroxiapatita y el fosfato de calcio han demostrado ser capaces de estimular la producción de citoquinas y proteasas (Korkusuz *et al.* 2004, Villa *et al.* 2008).

Los materiales de naturaleza polimérica, se vienen aplicando en una amplia variedad de elementos para uso farmacéutico y médico, en especial para la medicina regenerativa.

En las primeras fases del desarrollo de los biomateriales para regeneración o reemplazo de tejido, su selección se centró en buscar que fueran inertes y semejaran las propiedades físicas del material lesionado; sin embargo, con el tiempo se ha intentado que conlleven a una respuesta biológica específica (Siegwart *et al.* 2012).

Los andamiajes de polímeros, sean estos naturales o sintéticos, deben mimetizar la matriz extracelular de los tejidos, regulando su función y la difusión de nutrientes, metabolitos y factores de crecimiento. Para que funcionen como promotores de formación de nuevo tejido deben ser biocompatibles e idealmente degradables mientras mantienen ciertas propiedades físicas útiles para el crecimiento celular y la unión a proteínas estructurales adhesivas (Siegwart *et al.* 2012).

El uso de los polímeros no biodegradables se ha direccionado al diseño de implantes biomédicos permanentes. Estos polímeros deben poseer una morfología nano y microscópica, en algunos casos con respuestas inteligentes ante estímulos *in vivo* que permitan su aplicación para lograr acciones terapéuticas (Siegwart *et al.* 2012).

En este sentido, se ha llegado a obtener derivados de polímeros naturales (polisacáridos y proteínas) y sintéticos (poliésteres alifáticos y polifosfoésteres). Entre los polímeros naturales usados en aplicaciones biomédicas se encuentran el colágeno, la quitina, el quitosano, la seda y la elastina, todos ellos derivados de tejidos animales ( Liao *et al.* 2005, Mano *et al.* 2007, Stegemann *et al.* 2007). Existen de igual manera un grupo de polímeros naturales procedentes de materiales vegetales tales como el almidón, la celulosa y la pectina (Tamura *et al.* 2011, Dash *et al.* 2011, Su *et al.* 2013, Prajapati *et al.* 2014).

Entre la variedad de propiedades físicas que presentan los polímeros sintéticos se encuentra la ventaja de poseer una menor susceptibilidad a ser degradados con la temperatura permitiendo que pueden ser procesados en diversidad de formas según la funcionalidad que se requiera, permitiendo el diseño de estructuras tridimensionales (Pal *et al.* 2009; Mata *et al.* 2009, Abbah *et al.* 2009, Siegwart *et al.* 2012). Sin embargo, cabe resaltar que existen puntos de vista de investigadores que han planteado que los polímeros naturales suelen ser biocompatibles, mientras que los sintéticos no permiten el crecimiento celular, puesto que pueden contener residuos o impurezas de sustancias tipo iniciadores o catalizadores de la reacción de polimerización (Bide *et al.* 2006, Gupta y Kumar 2007, Luckachan y Pillai 2011).

Algunos investigadores plantean que los polímeros naturales presentan como desventaja que las modificaciones químicas pueden llegar a generar marcadas alteraciones de sus propiedades, mientras que cuando se realizan en materiales sintéticos se destaca que desencadenan reacciones inmunes en menor proporción, si se comparan con los materiales naturales. Además, se dice que permiten la obtención de una gran variedad de propiedades a través de modificaciones de diversa naturaleza sin que se lleguen a alterar sus propiedades estructurales. Así, ha sido posible obtener materiales con buenas propiedades físicas y de estabilidad térmica en comparación con los polímeros naturales; por tanto se suele considerar que son más viables estas modificaciones en los polímeros sintéticos (Wong y Mooney 1997, Croll *et al.* 2005, Drevelle *et al.* 2010).

En la actualidad, se comercializan elementos médicos tales como tornillos, pines y piezas para fijación y reparación ósea fabricados en materiales sintéticos biodegradables tales como: Ácido Poli L-láctico (PLLA), Policaprolactona (PCL), Ácido Poliglicólico (PGA) y Poli[d,l-(láctido-co-glicólido)] (PLGA). Estos materiales poseen muy buenas propiedades mecánicas y una excelente biocompatibilidad, razones por las cuales han sido aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) para aplicaciones *in vivo*, y se han usado ampliamente para *scaffolds* o andamiajes en Ingeniería de Materiales (Abbah *et al.* 2009, Woodruff y Hutmacher 2010, Gamboa *et al.* 2011, Bos *et al.* 2012, Seyednejad *et al.* 2012)

Con el fin de exaltar las propiedades relacionadas con el desempeño *in vivo* de los polímeros, se han formulado gran número de estudios que pretenden encontrar o proponer materiales compuestos (denominados *composites*) para ingeniería de tejidos a partir de materiales sintéticos, polímeros naturales y mezclas de biopolímeros biodegradables (Rizzi *et al.* 2001, Pereira *et al.* 2005, Reis *et al.* 2008, Poologasundarampillai *et al.* 2010, Rezaei y Mohammadi 2012, Rezaei y Mohammadi. 2013).



## 1.1 Los hidrogeles

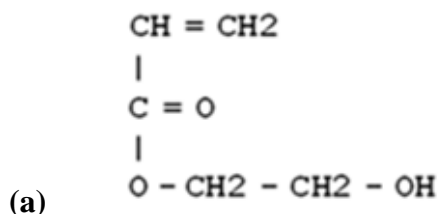
Los hidrogeles son polímeros entrecruzados con la capacidad de absorber agua en su interior, en proporciones que pueden llegar hasta 1000 veces el peso del hidrogel seco (xerogel) sin llegar a disolverse. Esta característica además de propiedades relacionadas con su biocompatibilidad los constituyen en potenciales biomateriales (Monleón Pradas *et al.* 2001a, Hoffman 2002, Pal *et al.* 2009).

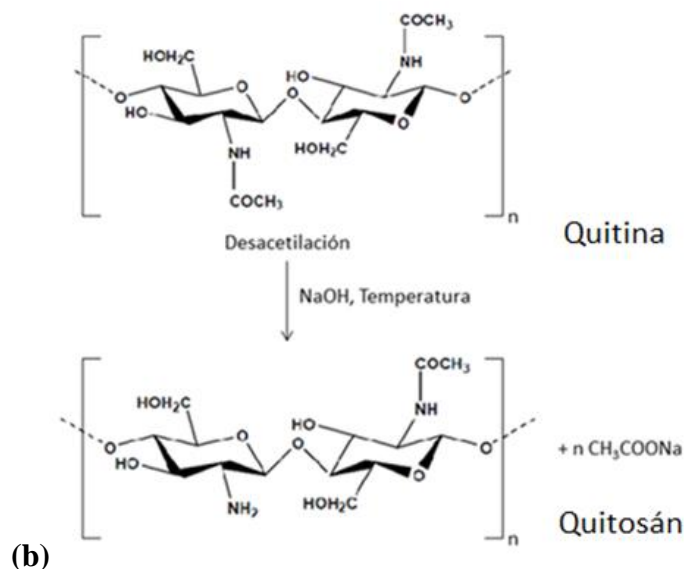
Una causa substancial de su capacidad de hinchamiento es la posibilidad de lograr producir poros en su estructura durante la fase de preparación o síntesis (Castilla Cortazar *et al.* 2001, Serrano Aroca *et al.* 2004), lo que a su vez favorece la difusión de solutos a través de la red polimérica. El tamaño del poro y su distribución, así como la interconexión de los mismos son factores relevantes que tienen influencia en la difusión efectiva de solutos a lo largo de la matriz polimérica y son dependientes de las condiciones de la polimerización (Monleón Pradas *et al.* 2001a, Monleón Pradas *et al.* 2001b, Serrano Aroca *et al.* 2007, Pal *et al.* 2009).

### 1.1.1. El poli (hidroxietil acrilato) (PHEA) y los hidrogeles de poli (acrilato)

El monómero básico del poli (hidroxietil acrilato) es el 2-hidroxietil acrilato, el cual posee una densidad de 1,106 g/cm<sup>3</sup> y comercialmente se presenta estabilizado con hidroquinona monometileter (200-400 ppm).

El poli (hidroxietil acrilato) se usa como gel polimérico hidrofílico y ha sido extensamente estudiado por sus amplias aplicaciones biomédicas exaltadas por favorecimiento al intercambio de fluidos, lo cual es un parámetro que define su biocompatibilidad. Entre las aplicaciones biomédicas de los hidrogeles se destacan los lentes de contacto blandos, la córnea artificial, los sustitutos de tejidos blandos y compresas para quemaduras, los catéteres o los detoxificantes de sangre, y los recubrimientos tromboresistentes (Vargün 2003).





**Figura 1 (a) Fórmula estructural del 2-hidroxietil acrilato. (b) Estructura de la quitina y el quitosano.**

No obstante las propiedades positivas de los hidrogeles, sus pobres propiedades mecánicas son frecuentemente visualizadas como inconvenientes en muchas de sus aplicaciones y por ello una investigación muy extensa se ha dedicado a buscar mejorarlas. En ese sentido, algunos estudios han explorado lograr este objetivo por medio de la alternancia de dominios hidrofílicos e hidrofóbicos a través de la copolimerización (Salmerón Sánchez *et al.* 2004a, Mun *et al.* 2004, Araújo *et al.* 2006, Gallego *et al.* 2007, Stathopoulos *et al.* 2010). Se ha planteado así, la formación de redes interpenetradas (IPN) en las cuales los componentes se separan en forma de dominios de tamaño nanométrico por combinación de dos polímeros en la red, en los cuales al menos uno es sintetizado en presencia del otro o es polimerizada una red primero y luego se hincha el monómero correspondiente en la segunda red, de forma que la polimerización de la segunda red tome lugar en la presencia del primero. Con esta aproximación, las dos redes son altamente interpenetradas a nivel molecular (Araújo *et al.* 2006).

Un ejemplo de una red IPN es la de poli (hidroxietil acrilato) (PHEA) y ácido poliacrílico (PAA), cuya estructura presenta una estabilidad térmica diferente a los componentes iniciales (Mun *et al.* 2004).

### 1.1.2. El quitosano como ejemplo de hidrogeles naturales

El quitosano es un copolímero natural, poli electrolito catiónico derivado de la quitina. La quitina es un homopolímero que comprende unidades 2 acetamido-2 deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosas. La mayor parte de las unidades en el quitosano existen en la forma desacetilada como 2-amino-2-deoxi  $\beta$ -D-glucopiranosas. Cuando la quitina se desacetila al

menos en un 50%, se torna soluble en ácidos diluidos y se denomina quitosano. La estructura de la quitina y el quitosano se presentan en la Figura 1.

Entre las características importantes que convierten al quitosano en material adecuado para aplicaciones biomédicas están sus mínimas reacciones producidas en el cuerpo (reacciones extrañas), su naturaleza antibacterial intrínseca y su capacidad para ser moldeada en estructuras porosas que permitan el crecimiento celular y la osteoconducción (Di Martino *et al.* 2005, Dutta *et al.* 2011, Tamura *et al.* 2011, Sionkowska 2011).

Por su naturaleza de gel es importante en aplicaciones donde se requiera que actúe como agente de liberación. Puede ser sometido a entrecruzamiento de tal manera que se obtenga un hidrogel con una estructura en red permanente pues se forman uniones covalentes irreversibles. Esta estructura le confiere propiedades de absorción de agua y de compuesto bioactivo sin disolverse y la capacidad para la liberación de fármacos por difusión bajo condiciones de pH controlados (Kim *et al.* 2008, Dutta *et al.* 2011, Sionkowska 2011).

Las propiedades generales del quitosano dependen del grado de desacetilación, sobre todo la cristalinidad y la biodegradabilidad (van relacionadas ya que las enzimas hidrolíticas no pueden entrar en una microestructura cristalina). La cristalinidad es máxima para la quitina y para el quitosano totalmente desacetilado, siendo mínima para grados de deacetilación intermedios (alrededor del 50%)(García 2008).

El quitosano al ser un polícatión es insoluble en medios básicos, pero soluble en medios ácidos. Tiene una estructura similar a la de los GAGs (glicosaminoglicanos), lo que le confiere buena biocompatibilidad. Cuando es implantado provoca una reacción inflamatoria mínima y aunque en algunos trabajos se haya observado neutrófilos alrededor del implante (quimiotaxis), no se suele observar respuesta inflamatoria crónica. Los quitosanos muy desacetilados son menos propensos a contener contaminantes, porque han sufrido un proceso de desacetilación muy agresivo. El quitosano ha mostrado muy buenos resultados sobre la actividad celular del tejido nervioso (Su *et al.* 2013) y del óseo, promoviendo el fenotipo y la segregación de glicosaminoglicanos y colágeno (García *et al.* 2008, García *et al.* 2010, Dutta *et al.* 2011).

El interés que ha despertado en el ámbito de la regeneración ósea cuando se observó que favorecía la deposición de matriz mineralizada por osteoblastos, forjó el desarrollo de varios *scaffolds* y materiales inyectables *in situ* para regeneración ósea (García *et al.* 2008, García 2008, Dutta *et al.* 2011).

El quitosano es hemostático y antibacteriano: se piensa que su carga positiva tiene la propiedad de enlazarse con los aniones de las membranas bacterianas, provocando el vaciado de su contenido celular y la desactivación de su material genético.

Los grupos hidroxilos y aminos que presenta permite el procesamiento en *scaffolds* y la realización de múltiples modificaciones químicas a fin de modular el comportamiento biológico, físico y de degradación de los implantes de quitosano, ya que entre otras acciones se le pueden injertar cadenas laterales, péptidos, hacer mezclas con polímeros sintéticos y con complejos poli electrolíticos y con poli aniones (Kim *et al.* 2008).

### 1.1.3. Los materiales compuestos hidrogel-sílice

Una estrategia muy usada para la obtención de biomateriales es la síntesis de compuestos orgánico/inorgánico con el fin de combinar las ventajas de los polímeros orgánicos (ej. flexibilidad, características dieléctricas, ductilidad, capacidad de procesamiento) y de los materiales inorgánicos (ej. rigidez, estabilidad térmica). Muchos de estos materiales compuestos involucran tamaños de relleno pequeños cuya área interfacial incrementa y es alta comparada con otros compuestos, y donde los dos componentes interactúan a nivel molecular (Zou *et al.* 2008, Arcos *et al.* 2010, Baino y Vitale-Brovarone 2011, Arafat *et al.* 2011, Valliant y Jones 2011, Elbert 2011).

En este sentido, los híbridos pueden ser clasificados en dos tipos dependiendo de las interacciones entre las cadenas inorgánicas y orgánicas. Clase I: híbridos donde hay una interacción interfacial física o débiles interacciones a nivel molecular como puentes de hidrógeno y /o fuerzas de van der Waals; los híbridos Clase II que poseen uniones covalentes, o donde las especies orgánicas usualmente portan grupos funcionales que puedan formar puentes de hidrógeno (Valliant y Jones 2011).

Cuando al menos una de las fases de los híbridos se encuentran a nivel de nanoescala (<100 nm), se denominan *nanocomposites*. Una técnica para lograr obtenerlos es a través de la síntesis sol-gel, en donde el polímero es introducido tempranamente en el proceso de tal forma que las cadenas inorgánicas (sílice) se forman alrededor de las moléculas de polímero llegando a interacciones de tipo molecular (Costantini *et al.* 2006, Vallés *et al.* 2010a, Vallés *et al.* 2010b).

Se han realizado un gran número de estudios con la intención de obtener *nanocomposites* de hidrogeles con propiedades mecánicas, físicas, químicas o biológicas mejoradas (Eglin *et al.* 2006). Una exploración rápida en este campo permite resaltar una primera propuesta en donde se obtuvo poli (vinil alcohol) (PVA) relleno con partículas de sílice por mezcla de una solución acuosa de PVA y una suspensión de sílice coloidal, realizando una evaporación final del solvente (Boisvert *et al.* 2003). En 2005, Pereira *et al.* usaron también PVA, un hidrogel biocompatible que debido a su solubilidad en agua permitió sintetizar los híbridos por introducción directa de una solución ácida de TEOS en la solución de PVA (Pereira *et al.* 2005). Cabe resaltar que en algunos estudios con *scaffolds*, nanocompuestos de PVA y vidrios bioactivos se identificaron propiedades mecánicas no satisfactorias, explicadas porque el PVA no se unía covalentemente a la fase del biovidrio. Para solucionar esto, los polímeros han sido funcionalizados por uniones covalentes a la sílice para así obtener un nanocompuesto híbrido caracterizado por una interacción íntima de los componentes a nivel atómico (Baino y Vitale-Brovarone 2011). En un estudio más reciente se ha elaborado un nanocompuesto obtenido por entrecruzamiento físico de PVA y Montmorillonita. Como conclusión relevante se encontró que no importa el tipo de interacción que ocurra entre las dos fases, la capacidad de hinchamiento del hidrogel disminuye por la incorporación del compuesto inorgánico (Sirousazar *et al.* 2012).

Con el fin de lograr alcanzar las propiedades mecánicas requeridas, se han obtenido una gran variedad de materiales compuestos polímero-sílice. Para ello, se han usado una amplia diversidad de métodos en la obtención de materiales compuestos, los que incluyen: 1. La

mezcla de nano partículas de sílice y el polímero (Boisvert *et al.* 2003, Huang *et al.* 2005, Costantini *et al.* 2006, Liu *et al.* 2007); 2. La realización del proceso sol-gel en presencia de una solución orgánica del polímero (Boisvert *et al.* 2003, Huang *et al.* 2005, Pereira *et al.* 2005, Costantini *et al.* 2006, Liu *et al.* 2008, Reis *et al.* 2008, Poologasundarampillai *et al.* 2010) y 3. La realización del proceso sol-gel y la reacción de polimerización de manera simultánea (Hajji *et al.* 1999, Costantini *et al.* 2006, Liu *et al.* 2008). De igual manera se ha trabajado en la introducción de grupos funcionales a lo largo de la estructura base del polímero que permita la formación de uniones covalentes entre las fase orgánica e inorgánica (Baino y Vitale-Brovarone 2011, Valliant y Jones 2011).

Otro grupo de hidrogeles que se han usado para preparar híbridos con sílice, son los polímeros simples metacrílicos del hidroxietilmetacrilato (HEMA) e hidroxietil acrilato (HEA) y sus co-polímeros (p (HEMA)/p (HEA)) (Hajji *et al.* 1999, Huang *et al.* 2005, Liu *et al.* 2008, Kakwere y Perrier 2011). Costantini *et al.*, en 2006 prepararon un hidrogel basado en poli (hidroxietil metacrilato) (PHEMA) y nano partículas de SiO<sub>2</sub>. El material compuesto fue caracterizado morfológicamente, en su capacidad de hinchamiento y bioactividad, comparándolo con el PHEMA puro (Costantini *et al.* 2006). Existen otros ejemplos de materiales compuestos polímero-sílice basados en hidroxietilmetacrilato (HEMA) e hidroxietil acrilato (HEA) obtenidos por polimerización simultánea con la síntesis de la red de sílice (Rodríguez *et al.* 2007, Rodríguez *et al.* 2008a, Vallés 2008, Vallés *et al.* 2010b).

Huang *et al.* emplearon dos métodos para preparar nanocompuestos de sílice/PHEMA: uno por mezcla directa de sílice coloidal con PHEMA usando metanol como cosolvente y otro por adición de una solución TEOS a la solución PHEMA en metanol, en medio ácido. La estructura del híbrido sílice coloidal /PHEMA se evidenció como una fase de nano sílice dispersa uniformemente en la fase de PHEMA con unas escasas uniones de hidrógeno intermolecular. La estructura del híbrido TEOS/PHEMA reveló ser una red semi-interpenetrada de cadenas de PHEMA unidas a la red de nano sílice por uniones inter e intramoleculares de hidrógeno (Huang *et al.* 2005). Estudios con poli (HEMA)/sílice habían ya demostrado la producción de nanocompuestos cuyas partículas estaban en el rango de 20-30 nm (Lin *et al.* 2002).

Normalmente la polimerización de HEMA o HEA es más lenta que la reacción sol-gel y la red de sílice se forma en presencia de los monómeros, los cuales actúan como estructura base haciendo que esta sea nanoporosa (Rodríguez *et al.* 2007, Kakwere y Perrier 2011).

## 1.2. La policaprolactona como polímero biodegradable y los materiales compuestos de policaprolactona-sílice

Los materiales poliméricos sintéticos ofrecen propiedades de alta relevancia en aplicaciones biomédicas, como son las propiedades mecánicas, la difusividad y la densidad; además de la posibilidad de que se pueden procesar en estructuras denominadas andamios o *scaffolds*, estructuras porosas que desempeñan el papel de una matriz extracelular sintética, permitiendo la adhesión y diferenciación celular. Entre los métodos de procesamiento de andamios, que permiten el control de la arquitectura tridimensional interna de los biomateriales, están la separación de fases, la lixiviación de partículas, la liofilización de una mezcla y la polimerización en presencia de un disolvente.

La Policaprolactona (PCL) es un poliéster alifático biocompatible y biodegradable, con bajo punto de fusión, buena solubilidad en la mayoría de disolventes y presenta una temperatura de transición vítrea a  $-60^{\circ}$  C. En consecuencia es bastante flexible, con un módulo elástico bajo para aplicaciones en la ingeniería de tejidos (está en el rango  $\sim 10$  a 280 MPa (Avella *et al.* 2000, Eshraghi y Das 2010, Shin *et al.* 2011), siendo aún más bajo en las membranas porosas, con valores entre 0,5 y 8 MPa, en función de la extensión de la porosidad del material ( Lebourg *et al.* 2008a, Lebourg *et al.* 2008b).

Su velocidad de degradación es muy lenta, pudiendo tardar de 2 a 4 años *in vivo*, y bastante más *in vitro*. En efecto la degradación hidrolítica de PCL puede ser considerada una reacción lenta, sin embargo los mecanismos de degradación enzimática logran contribuir a la reabsorción de los implantes PCL *in vivo* (Lu *et al.* 2012, Seyednejad *et al.* 2012) . No es tóxica, ni mutagénica pero no presenta bioactividad intrínseca. Se ha estudiado como sistema de liberación controlada de fármacos, en ingeniería tisular en aplicaciones de ingeniería de tejido endotelial vascular/esofágico, en ingeniería tisular de hueso y cartílago, reforzada ocasionalmente con componentes inorgánicos. En implantes *in vivo* en modelos animales, la PCL ha mostrado soportar la regeneración de tejido óseo sin provocar una reacción inflamatoria marcada. También se ha usado en mezclas o copolimerizada con otros polímeros tales como el PLA, el quitosano, el PEG y el PHEA (Lebourg *et al.* 2008b, Gaona *et al.* 2012).

La PCL se ha propuesto como material en ingeniería de tejido óseo (Chim *et al.* 2006, Abbah *et al.* 2009, Arafat *et al.* 2011, Lu *et al.* 2012) para producir *scaffolds* por técnicas como prototipado rápido (Hutmacher *et al.* 2001, Williams *et al.* 2005, Arafat *et al.* 2011), el uso de preformados ( Rodríguez *et al.* 2008b), por extracción en fase congelada (Lebourg *et al.* 2008b, Gaona *et al.* 2012) y por vertido (Puppi *et al.* 2010). En los materiales para implantes además de contar con un cierto grado de porosidad para permitir la siembra y la proliferación de las células, deben demostrar interconectividad de los poros para permitir la migración de nutrientes, de factores de crecimiento y de residuos metabólicos (Lebourg *et al.* 2008a).

En el campo de la ingeniería de tejido óseo se han desarrollado una gran variedad de matrices de polímeros sintéticos con fines biomédicos tales como la policaprolactona (PCL), la polilactida (PLA), el poliglicólido (PGA) y sus copolímeros (PLGA); combinados con cargas cerámicas, como materiales promisorios permitiendo combinar así las ventajas de estos materiales poliméricos (facilidad para ser obtenidos en formas porosas y su naturaleza dúctil) y de las cerámicas (que han demostrado tener efectos positivos en la formación de hueso y de las células *in vivo* e *in vitro*). Al ser combinados los dos materiales, se trata de manejar las desventajas que cada material presenta (falta de bioactividad intrínseca de los biopolímeros, puesto que no inducen ninguna regeneración celular positiva) y la fragilidad y la dificultad de las cerámicas para ser procesados en estructuras porosas interconectados, condición necesaria para la propagación y la colonización de células (Lebourg *et al.* 2010b). Entre las cerámicas de mayor uso, vale la pena citar los fosfatos de calcio, el Bioglass y la hidroxiapatita.

Entre la gran diversidad de materiales compuestos basados en PCL que buscan aumentar la rigidez y mejorar su bioactividad, se han usado nano o micro partículas de fosfato tricálcico (TCP) (Woodruff y Hutmacher 2010), partículas de wollastonita mesoporosa (Kotela *et al.* 2009, Wei *et al.* 2009), *Bioglass* 45S5® (Chouzouri y Xanthos 2007, Fabbri *et al.* 2010, Cannillo *et al.* 2010, Moussaif *et al.* 2012), e hidroxiapatita (Rizzi *et al.* 2001, Shor *et al.* 2007), como material de relleno para PCL. Para dispersar la fase inorgánica en PCL, se han usado métodos como son el moldeo empleando disolvente, la separación de fases sólido-líquido y la fusión de mezclas.

Al evaluar la respuesta biológica de los *composites* de PCL con refuerzo cerámico, se han obtenido resultados que muestran baja citotoxicidad y una mayor adhesión celular. La diferenciación osteoblástica parece ser dependiente de la distribución de la carga en el material compuesto (Rizzi *et al.* 2001, Reffitt *et al.* 2003, Fabbri *et al.* 2006, Fabbri *et al.* 2010, Cannillo *et al.* 2010, Deb *et al.* 2010, Ródenas-Rochina *et al.* 2013). Con el propósito de mejorar la bioactividad, se ha aplicado un variado número de procesos para el revestimiento de los macroporos de los *scaffolds* con hidroxiapatita como es la inmersión en fluidos corporales simulados (Lebourg *et al.* 2008b, Lebourg *et al.* 2010a, Lebourg *et al.* 2010b).

En relación con la propiedad de la degradación, es importante citar que la definición depende del campo de aplicación de los polímeros (área biomédica o del medio ambiente natural). Se ha definido desde el punto de vista ambiental como un evento que ocurre a través de la acción de enzimas y/o descomposición química asociada con organismos vivos y sus productos de secreción. La biodegradación de un polímero se define como el deterioro de sus propiedades físicas y químicas y una disminución de su masa molecular para la formación de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub> y otros productos de bajo peso molecular producto de la influencia de los microorganismos en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas, ayudados por reacciones químicas como la fotodegradación, la oxidación y la hidrólisis. Cuando el concepto se aplica a la medicina y a la cirugía, se dice que el polímero se degrada *in vivo* en cuatro pasos: (1) Hidratación – interrupción de los enlaces Van der Waals y de hidrógeno. (2) Pérdida de Resistencia – escisión de enlaces covalentes de la estructura orgánica. (3) Pérdida de Masa e Integridad, por un mayor rompimiento de los

enlaces covalentes del polímero a niveles moleculares y de peso insuficiente para la coherencia de la masa y (4) Pérdida de Masa (solubilización), por disolución de especies de bajo peso molecular y la fagocitosis de los fragmentos pequeños (Luckachan y Pillai 2011).

Por tanto, se podrían consolidar como características para un implante biodegradable las siguientes: la capacidad de conformado, la resistencia y la estabilidad dimensional inicial, la velocidad controlada de la pérdida de resistencia, la capacidad de absorción completa y el bajo grado de toxicidad tanto del implante como de los productos de degradación debidas entre otras condiciones a procesos de esterilización (Luckachan y Pillai 2011).

Otras exigencias de los biomateriales para regeneración de tejido óseo; incluyen que además de ser bioactivos y mecánicamente compatibles con el tejido natural en donde se implantan debe comportar la propiedad de ser osteogénicos; es decir, de generar hueso nuevo a partir de células capaces de regenerar hueso. Para esto deben cumplir con la capacidad de ser osteoinductivos, dicho de otra forma, de promover la mitogénesis de células mesenquimales indiferenciadas y la formación de células progenitoras con capacidad para formar hueso (De Long *et al.* 2007).

Finalmente, otra propiedad requerida para los biomateriales con fines de reemplazo o regeneración ósea es la osteoconductividad, que consiste en la capacidad del material de sostener el crecimiento de capilares, de tejidos perivasculares y de células osteoprogenitoras en la estructura tridimensional del implante. En realidad este proceso puede ocurrir por una neoformación ósea activa, por osteoinducción o puede suceder pasivamente sin la participación de un implante. En caso de estar presente el implante, este proceso sigue un patrón espacial ordenado y predecible determinado por su estructura, la presencia del biomaterial, el aporte vascular de los tejidos colindantes y el ambiente mecánico (Vicario 2004).

Las estrategias que se han visualizado para obtener un material osteointegrable involucran la disposición de superficies osteoinductivas y osteoconductivas, las cuales pueden lograrse a través de acciones a nivel fisicoquímico (Hoffman 1996, Ratner *et al.* 2012), morfológico o bioquímico (Hoffman 1996, Lemons 1996).

Se han estudiado varias modificaciones de superficie de la PCL para mejorar la adhesión celular. Entre estos se encuentran los tratamientos con plasma, la introducción de péptidos, el recubrimiento con proteínas o con una capa mineral biomimética (Chim *et al.* 2006).

Con el propósito de mimetizar algunas características de los tejidos del organismo y mejorar las propiedades mecánicas de una amplia variedad de materiales de naturaleza polimérica de origen natural o sintética; se han ensayado diversos materiales inorgánicos tales como la hidroxiapatita, la sílice y la aragonita (Meyers *et al.* 2008, Sionkowska 2011). Se han por ejemplo intercalado nanopartículas con el fin de lograr materiales nanonestructurados inorgánicos en matrices poliméricas pretendiendo que sean usados tanto en tejidos blandos como duros (Rezwan *et al.* 2006, Reis *et al.* 2008, Sionkowska 2011, Bikiaris *et al.* 2012).



La incorporación de partículas inorgánicas como hidroxiapatita y tricalciofosfato (TCP), mejoran ligeramente la respuesta de células osteoblásticas y la mineralización *in vitro*, a la vez que aumentan la velocidad de degradación, posiblemente por un aumento de las propiedades hidrofílicas del material (Rezwan *et al.* 2006, Rim *et al.* 2011).

Por otra parte, se ha dado una gran atención al estudio de las vías metabólicas biológicas que involucran el silicio y su papel en la osteogénesis y la biogénesis. La información de la sílice ( $\text{SiO}_2$ ) como un material biocompatible y bioactivo ha estimulado el interés en experimentar con las propiedades biológicas de esta cerámica, tales como la actividad en el entorno de tejido óseo, la tasa de reabsorción, la porosidad, la capacidad para inducir superficialmente en materiales la formación de fosfato de calcio mineral similar al hueso (Shin *et al.* 2011), así como la posibilidad de introducir en ella agentes biológicamente activos (Hoppe *et al.* 2011).

Algunos estudios han explorado también la posibilidad de modular estas propiedades, tanto para la ingeniería de tejidos, como para aplicaciones en administración de fármacos (Kotela *et al.* 2009, Korventausta *et al.* 2003). Adicionalmente puesto que los refuerzos de sílice se utilizan con frecuencia en forma de nano partículas, el entendimiento de los mecanismos de disolución y del metabolismo de estas partículas en el organismo también han sido objeto de estudio (Hoppe *et al.* 2011).

### **1.3. El óxido de silicio y su bioactividad.**

El silicio es el metal más abundante en la corteza terrestre y se presenta con frecuencia dentro de los procesos naturales a través de fenómenos de hidrólisis y condensación formando especies de polisilicato que evolucionan en forma de partículas esféricas de  $\text{SiO}_2$  anhidro. El silicio ha sido reconocido como un elemento esencial y se ha identificado su papel en el desarrollo óseo en estados tempranos de la calcificación (Price *et al.* 2013).

La sílice y los materiales con base en ella, especialmente aquellos que involucran tamaños nanométricos, se han estudiado con el fin aplicarlos en ingeniería de tejidos (Borum y Wilson 2003, Pietak *et al.* 2007, Bose *et al.* 2012, Jones 2013), en regeneración ósea y han sido desafiados respecto a su actividad en la proliferación de células osteoblásticas (Kokubo 2005).

Una gran variedad de materiales que involucran sílice se han visualizado como una buena opción para la sustitución de tejido óseo cuando hay pérdida de este tejido ya sea por una cirugía, por la remoción de un tumor o por algún trauma óseo (Lee *et al.* 2009, Lee *et al.* 2010, Lee *et al.* 2011). Ello se explica ya que la sílice puede inhibir la invasión de tejido

conectivo cuando se presenta un defecto óseo mejorando así la regeneración (Feng *et al.* 2007).

Adicionalmente, se ha reportado que el silicio tiene un potencial activador de los genes relacionados con la activación de la regeneración ósea favoreciendo así la proliferación celular; propiedad que se ha visto más marcada con tamaños nanométricos. Estudios *in vitro* han demostrado que tanto la sílice como los iones silicio que pueden liberarse de ella, estimulan las células osteoblásticas para generar hueso y producen un efecto osteoinductivo; no obstante debería de igual manera reconocerse que una liberación inicial elevada de iones silicio pueden tener un efecto tóxico, por lo cual es importante tener en cuenta esta situación cuando se realiza la evaluación del material ( Feng *et al.* 2007, Lee *et al.* 2011).

En 1991, Kokubo (Kokubo 1991) elucidó que la condición esencial de un material artificial para unirse al hueso vivo al ser implantado, era la formación en la superficie de una capa de apatita similar a la ósea. Por lo tanto, para evaluar la bioactividad de un material *in vitro*, se suele valorar la deposición de apatita, condición que a su vez se relaciona con la unión del hueso *in vivo*. Con este fin se ha usado en investigación, la técnica biomimética que consiste en apreciar la deposición de apatita similar a la ósea cuando las estructuras se someten a inmersión en fluido corporal simulado (SBF). Este fluido corporal simulado tiene una concentración de electrolitos similar a los del plasma sanguíneo humano, por tanto un aspecto importante de la aplicación de esta metodología consiste en controlar la composición de la solución del fluido corporal simulado (SBF), que es capaz de reproducir *in vitro* los cambios que normalmente ocurren fisiológicamente cuando un material bioactivo se implanta en el cuerpo antes de que ocurra la unión ósea (Korventausta *et al.* 2003, Rahman *et al.* 2006, Mieszawska *et al.* 2010).

Las soluciones electrolíticas, denominadas soluciones de fluidos corporales simulados (SBF) reproducen la parte inorgánica del plasma y se ha asumido que la estructura de los precipitados que se forman en la superficie debe ser similar a los que se forman en el hueso (apatita). Las soluciones de SBF normalmente al ser comparadas con el plasma humano, difieren en el contenido del ion bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y del ion cloruro ( $\text{Cl}^-$ ). Se han propuesto diversas formulaciones para el SBF, y también la opción de multiplicar la concentración de SBF para acelerar la formación de apatita ya que el cambio en estos factores tiene una influencia decisiva sobre las propiedades de la apatita formada (cristalinidad, relación Ca/P). Tal es el caso de la modificación de la concentración de carbonato o el pH de SBF, que algunos autores afirman permite obtener una mejor proliferación de los osteoblastos o células precursoras de osteoblastos, una mejor expresión de marcadores osteogénicos (fosfatasa alcalina y producción de osteocalcina) o una mejor morfología de los osteoblastos (Kokubo 1991, Kokubo 2005, Kokubo y Takadama 2006, Jalota *et al.* 2006).

Es importante establecer que de acuerdo a experiencias de varios investigadores, las células reaccionan a ligeras variaciones en la química y la morfología de la apatita, dando lugar a resultados contradictorios y por tanto la composición precisa, la morfología y la solubilidad de la apatita formada debe ser evaluada (Jaakkola *et al.* 2004, Jalota *et al.* 2006, Lebourg *et al.* 2010a).

El mecanismo con hidroxiapatita ha sido estudiado en detalle por Kokubo *et al.*: Debido a los potenciales superficiales negativos, los cationes de calcio son atraídos y se deposita fosfato de calcio amorfo rico en calcio, hasta que se invierte potencial de superficie; posteriormente el fosfato de calcio amorfo rico en fosfato se deposita y esta capa inorgánica amorfa finalmente cristaliza en apatita. La apatita formada está carbonatada, es moderadamente cristalina, y puede contener átomos de sustitución como Mg y Na, siendo más similar a la apatita del hueso que las sintéticas (altamente puras y cristalinas), razón por la cual se denomina “biomimética” (Kokubo 1991, Kokubo y Takadama 2006, Vallés *et al.* 2009).

La biomineralización puede ser inducida por grupos funcionales específicos que actúan como sitios activos para la nucleación heterogénea de apatita, aún si el calcio y el fósforo están ausentes de la composición (Oliveira *et al.* 2003, Kim *et al.* 2004, Kim *et al.* 2005).

El intercambio iónico conlleva a dos condiciones: un aumento de pH y un incremento en la actividad iónica de la apatita en el medio SBF, el cual ya está saturado con relación a HAp. Una vez que el precursor de hidroxiapatita se forma o se nuclea, crece espontáneamente consumiendo iones calcio y fosfato del medio ya que el SBF está sobresaturado con respecto a la apatita. Durante el proceso, el fosfato de calcio amorfo incorpora iones  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CO}_3^{-2}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{+2}$  de la solución y finalmente cristaliza en HAp, que es el fosfato de calcio más estable en medios acuosos, convirtiéndose en una capa de HAp policristalina aglomerada sobre el sustrato a partir de la hidroxiapatita carbonatada (Kim *et al.* 2004, Kim *et al.* 2005).

En el mecanismo de deposición de apatita de los denominados vidrios bioactivos, hay dos fenómenos de superficie importantes: La difusión preferencial y controlada de iones sodio y calcio fuera del vidrio por intercambio con protones de la solución, y la hidratación y disolución de la red de sílice, la cual es más bien lenta a pH fisiológico (Devreux *et al.* 2001).

## **1.4. La reacción Sol-Gel como herramienta para obtener gel de sílice y producir materiales bioactivos**

Un sol es una suspensión coloidal de partículas de tamaño entre 1-1000 nm en un líquido; lo que conlleva a que en ella ocurran movimientos brownianos (movimientos al azar dados por colisión de las partículas con moléculas del medio de suspensión), de forma que no llega a presentarse la acción de fuerzas gravitacionales, y lo que predomina son las interacciones interparticulares de corto rango (Van der Waals y cargas superficiales).

Cuando una partícula de sol se agrega en más de dos unidades puede llegar a formar redes tridimensionales. Una vez alcanza tamaño macroscópico y se extiende a través de la solución, la sustancia es llamada gel. Un gel es una sustancia que contiene una estructura sólida dentro de una fase de líquida continua. La continuidad de la estructura sólida es la que da la elasticidad al gel. Su característica básica no se relaciona con el tipo de uniones químicas que presenta ni con su estabilidad. Por ende, el gel podía definirse en forma más exacta como una fase continua sólido-fluido de dimensiones coloidales (Brinker *et al.* 1982, Brinker y Sherer 1990, Besbes *et al.* 2009).

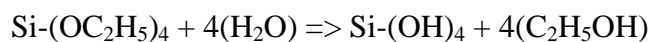
Como su nombre lo indica, la reacción sol-gel se produce por medio de la transformación de una solución, llamada sol a un estado de gel, una suspensión de partículas sólidas en un líquido. La subsecuente polimerización, la convierte en una red en la cual una fase sólida está en una líquida. Solo cuando la red alcanza un tamaño macroscópico es que se denomina gel. A medida que se forma la red, se alcanza un cierto nivel de rigidez; hasta que llega a un punto donde la red se contrae, expulsa el líquido que se encuentra dentro de los poros y que es atrapado durante la polimerización, fenómeno denominado sinéresis. Durante el secado, las características del gel se modifican. En este paso, inicialmente los poros son vaciados por gradiente de capilaridad lo que hace que el líquido fluya hacia la superficie externa hasta que el líquido remanente en forma de gas deja el gel solo por difusión de vapor hacia la superficie (Brinker *et al.* 1982, Brinker y Sherer 1990, Besbes *et al.* 2009).

Las reacciones sol-gel se ha convertido en una metodología útil aplicada para la producción de sílice, que ofrecen ventajas importantes en la síntesis de biomateriales debido a su simplicidad, bajo costo y eficiencia en la producción de materiales de alta calidad (Gurav *et al.* 2010). Sin embargo es importante resaltar que los reactivos químicos involucrados en la síntesis: precursor, solvente, agua, catalizador y aditivos, afectan en forma marcada el desarrollo de la reacción (Hench y West 1990).

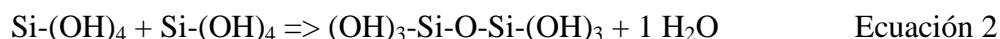
El proceso de la reacción sol-gel se puede dividir en varios pasos, en los cuales al intervenir se puede conseguir una diversidad de propiedades en el material obtenido (Hench y West 1990, Hench 2006, Gurav *et al.* 2010):

Paso 1: Mezcla. Un precursor líquido de alcóxido, tal como  $\text{Si}(\text{OR})_4$ , siendo R igual a  $\text{C}_2\text{H}_5$ , en el caso de tetraetilortosilicato (TEOS), se hidroliza mediante su mezcla con agua (Ecuación 1). Entonces, la sílice hidratada tetraédrica interactúa por una reacción de condensación para formar uniones  $\equiv \text{Si}-\text{O}-\text{Si} \equiv$ . (Ecuación 2).

Hidrólisis de tetraetilortosilicato ( TEOS ) Ecuación 1



Condensación:



La red de  $\text{SiO}_2$  es el resultado de la asociación de grupos  $\equiv \text{Si}-\text{OH}$  tetraédricos en una reacción de policondensación. El agua y el alcohol que se producen durante la reacción permanecen en los poros de la red y las partículas actúan como un sistema coloidal (o un sol) cuando se forma un número suficiente de enlaces interconectados de  $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ . El tamaño y la densidad de reticulación de las partículas del sol dependen del pH, la relación R ( $R = [\text{HO}]/[\text{Si}(\text{OR})]$ ) y algunas otras condiciones de proceso como la temperatura, la naturaleza y concentración de electrolito, la naturaleza del disolvente y tipo del precursor de alcóxido. Con relación al electrolito, la presencia de  $\text{H}_3\text{O}^+$  aumenta la tasa de la reacción de hidrólisis, mientras que los iones  $\text{OH}^-$  aumentan la velocidad de reacción de condensación.

A bajos pH, la hidrólisis se produce por el ataque electrofílico del grupo alcóxido en el átomo de oxígeno, mientras que a un pH más alto, la hidrólisis y polimerización se producen por el ataque nucleofílico del ión silicio. La forma y el tamaño de las unidades estructurales poliméricas se ven afectadas por los valores relativos de las constantes de velocidad para la hidrólisis y las reacciones de policondensación.

Los polímeros lineales se producen debido a una hidrólisis rápida y una condensación lenta, mientras que la hidrólisis lenta y condensación rápida causa polímeros más grandes, más voluminosos y más ramificados. La naturaleza del disolvente y de los grupos alcoxi tiene efecto principalmente sobre velocidad de hidrólisis, de tal manera que cuanto más voluminoso es el grupo alcóxido, más lenta es la hidrólisis.

Paso 2: La gelificación. Las características físicas de la red tridimensional producida por la interacción de las partículas coloidales de sílice y especies condensadas, dependen del tamaño de las partículas y el grado de reticulación. Como se ha dicho la distribución de especies de polisilicato es más amplia para las condiciones de reacción alcalinas, dando un polímero ramificado característico con un alto grado de reticulación, mientras que para condiciones ácidas hay un menor grado de reticulación debido a impedimento estérico (Gurav *et al.* 2010).

Paso 3: El envejecimiento o sinéresis. En este paso, la policondensación continúa en solución, durante horas o incluso días, aumentando los tamaños de las partículas y disminuyendo la porosidad. A través del envejecimiento, el gel podría desarrollar la fuerza suficiente para resistir el agrietamiento durante el secado.

Paso 4: Secado. Se elimina el líquido de la red de poros interconectados.

Paso 5: Estabilización química. Es la eliminación de los grupos silanol (Si-OH) de la superficie de la red de poros de un sólido ultraporoso químicamente estable (Hench y West 1990, Gurav *et al.* 2010).

El método sol-gel ha sido ampliamente usado para sintetizar materiales híbridos orgánico-inorgánicos. Bajo condiciones de preparación controlada la escala de las partículas formadas que han sido reportadas están en el rango entre 10 y 100 nm (Hajji *et al.* 1999). A través de su aplicación, se ha buscado la interacción a nivel nanométrico de los constituyentes de materiales compuestos, habiéndose detectado que las redes acumuladas de sílice en las matrices de los polímeros reducen su capacidad de hinchamiento y que por encima de un valor crítico de la fracción de volumen de relleno, la interconexión en la red puede llegar a tornar frágil el material (Boisvert *et al.* 2003).

Dado que una vez implantados, los biomateriales interactúan con el organismo a través de sus superficies e interfases, las propiedades superficiales cumplen un papel crucial en reacciones de interacción con células, siendo estas un aspecto crítico a tener en cuenta para controlar la respuesta biológica del material (Williams 1987). Es por ello que se ha propuesto realizar modificaciones superficiales a materiales poliméricos a través de diversas tecnologías que buscan lograr la presencia de grupos funcionales que favorezcan la adsorción, la adhesión de biomoléculas o átomos o la deposición de micropartículas tales como especies inorgánicas funcionales. Con el fin de mejorar la adhesión interfacial a través de la unión química entre las fases orgánicas e inorgánicas algunos estudios se han enfocado a modificar químicamente o físicamente, ya sea los polímeros o las nano partículas de sílice (Borum y Wilson 2003, Calandrelli *et al.* 2010).

Desde que Hench, en 1971 (Hench 2006) descubrió el 45S5 Bioglass®, compuesto por 24.5 % m/m de Na<sub>2</sub>O y de CaO, 45 % m/m de SiO<sub>2</sub> y 6 % m/m de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, el cual parecía adherirse fuertemente al tejido óseo; un gran número de investigaciones se han direccionado a la obtención de materiales que presenten la propiedad denominada bioactividad. En general se dice que un material es “bioactivo” si induce una actividad biológica específica (Kokubo 2005). Los materiales se pueden denominar “bioactivos” sí cuando son implantados en el organismo se unen al hueso vivo por medio de la formación de una capa de hidroxiapatita (HAp) similar a la apatita ósea, desde el punto de vista químico y de cristalinidad; produciendo una fuerte unión química con el hueso mientras disminuye la energía interfacial material-tejido óseo (Kokubo 1991, Kokubo 2005).

Parece que un requisito para la formación de apatita en el caso del biovidrio es una gran cantidad de grupos silanol sobre el sustrato. El mecanismo con el óxido de silicio ocurre en forma similar en medio fisiológico (pH 7.4), la sílice se carga negativamente y

lleva a la formación de grupos silanoles. La degradación por hidrólisis de la red de sílice ocurre a través de las reacciones que conducen finalmente a la liberación de iones Si (OH)<sub>4</sub> al medio conllevando a la formación de grupos ≡Si-OH en la interfase biovidrio-solución. Los grupos ≡Si-OH son quienes proveen los sitios favorables a la nucleación de la apatita, proceso que se acelera con el aumento del número de iones Ca<sup>+2</sup> (Devreux *et al.* 2001, Hutchens *et al.* 2006, Rimer *et al.* 2007, Kawai *et al.* 2007).

Los grupos ≡Si-OH que se forman en la interfase muestran cargas negativas por disociación o distribución local de la densidad electrónica. El vidrio adquiere una carga negativa que exalta la interacción electrostática con iones calcio del medio, cargados positivamente.

De esta manera se forma silicato de calcio amorfo portando cargas positivas o neutras, según las reacciones Ecuación 3, Ecuación 4 y Ecuación 5:



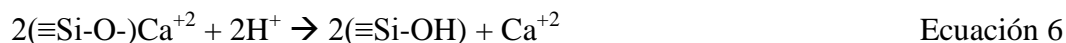
Como la superficie adquiere cargas positivas por acumulación de iones calcio, estas interactúan electrostáticamente con las cargas fosfato negativas del medio SBF, llevando a la formación fosfato de calcio amorfo, el cual crece en sentido hacia el exterior de la superficie del sustrato por suministro de iones fosfato y calcio del medio SBF, precursores de la formación de hidroxiapatita.

La carga superficial negativa de las especies ≡Si-O<sup>-</sup> a pH altos, controla la velocidad de disolución del mismo (Rimer *et al.* 2007). Dado que el pH del SBF (7.4) es mucho mayor que el punto isoeléctrico de la sílice (~2), la sílice es más soluble en medio básico que ácido (Brinker y Sherer 1990).

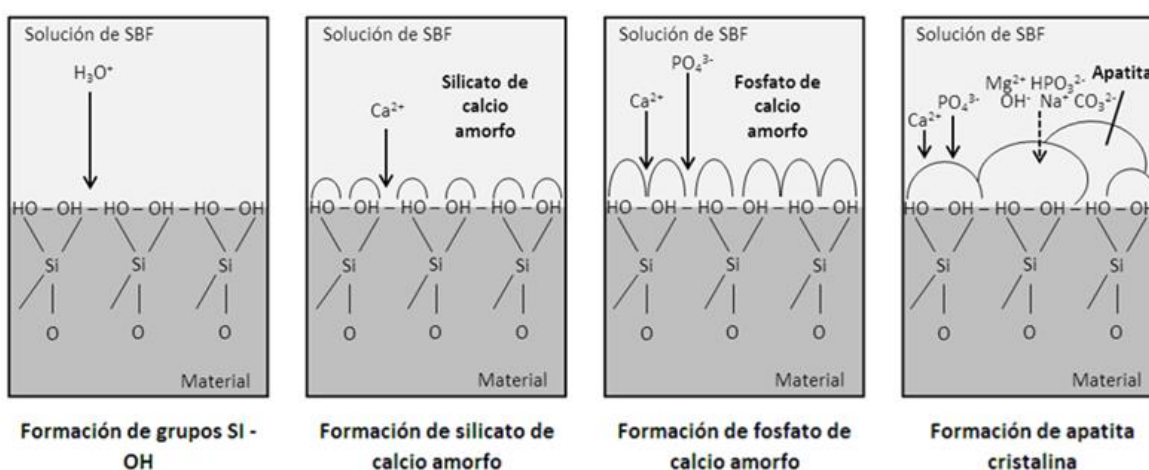
Cuando el vidrio bioactivo se produce por reacción sol gel a bajas temperaturas y con contenidos hasta un 80% de sílice, la forma irregular de la estructura es soluble en fluidos fisiológicos y es bioactivo, propiedad que ha sido verificada cuando se han realizado ensayos con SBF *in vitro* (Vallés *et al.* 2009, Vallés *et al.* 2010c, Arcos y Vallet Regí 2010).

La capacidad de la superficie de un material para precipitar fosfato de calcio desde SBF depende de su capacidad para disminuir las barreras de activación de la precipitación espontánea (Jaakkola *et al.* 2004, Eglin *et al.* 2006). Esto puede tener lugar ya sea por una nucleación homogénea en solución, por la modificación de la concentración crítica de saturación vía liberación de iones calcio o de ácido silícico o por nucleación heterogénea sobre sitios superficiales específicos, por lo que la presencia de calcio en la red de sílice facilita la hidrólisis y liberación de iones al medio modificando así la saturación de la solución de SBF.

Realmente los iones calcio de vidrios bioactivos producen nucleación de la apatita por ocurrencia de una de las dos reacciones siguientes:



De la revisión del mecanismo de bioactividad, se puede concluir que la incorporación de sílice a materiales poliméricos derivada de las reacciones sol-gel, se convierte en una alternativa interesante ya que además de mejorar las propiedades mecánicas de la matriz orgánica, al mismo tiempo confiere bioactividad a los materiales resultantes.



**Figura 2 Mecanismo propuesto para la formación de apatita cristalina cuando la sílice entra en contacto con SBF. Inspirado en Vallés Lluch, 2008 (Vallés 2008).**

Se ha evaluado el efecto de tratamientos superficiales por inmersión del material en soluciones iónicas; tal es el caso de un material a base de óxido de titanio que se sometió a inmersión en concentraciones variables de bicarbonato (Müller *et al.* 2007). De hecho, diferentes grupos, además del  $\text{Si-OH}$  son capaces de desarrollar cargas negativas al pH del plasma sanguíneo, identificándose como nucleantes efectivos de fosfato de calcio; entre ellos que se encuentran los grupos carboxilo, hidroxilo, amina y sulfónico (Oyane *et al.* 1999). El mecanismo de la formación de apatita se cree que involucra interacciones electrostáticas de estos grupos funcionales y los iones presentes en el SBF.



# **CAPÍTULO 2. Materiales y Métodos**

## **2.1. Elaboración de films de PHEA y sus híbridos**

### **2.1.1. Materiales/ Equipos**

#### *Elaboración de membranas de PHEA*

Reactivos: HEA al 96%, de Aldrich; Benzoína al 98%, de Scharlab; Etilenglicol dimetilacrilato (EGDMA) al 98%, de Aldrich; Etanol absoluto, grado síntesis, de Scharlab; Agua purificada.

Equipos: Placa de agitación magnética, cabina de extracción, balanza con sensibilidad al 0.01 gramo, estufa de convección de aire para polimerización a 90 °C, estufa con lámparas ultravioleta.

## Elaboración de híbridos de PHEA-SÍLICE

Membranas de PHEA; Tetraetilortosilano o tetraetoxisilano (TEOS), grado reactivo al 98%, de Aldrich; Agua purificada; Ácido clorhídrico, grado reactivo al 37%, de Aldrich.

### 2.1.2. Métodos

#### *Elaboración de láminas de PHEA microporoso y de PHEA con diversas macroporosidades.*

Para obtener láminas de PHEA microporoso, se polimerizó 2-hidroxietil acrilato (HEA) 96%, a temperatura ambiente y con radiación UV por 6 horas. Como foto-iniciador se usó 0.5% m/m de benzoína; y como agente entrecruzante, Etilenglicol dimetilacrilato (EGDMA) al 1%. Para la obtención de láminas macroporosas de PHEA, se prepararon soluciones de HEA con 20%, 30%, 40% y 50% de etanol grado síntesis en peso. Las láminas se obtuvieron mediante la introducción de las soluciones poliméricas con y sin alcohol, en placas de vidrio montadas de tal manera que no permitieran fugas de la solución durante el proceso de polimerización en la estufa con lámparas U.V., y posterior curado a 90°C por 24 horas. Una vez finalizado el proceso de polimerización y curado, las muestras se sometieron a lavado con agua purificada durante 24 horas a 60-70°C (cambiando el agua cada 8 horas), y finalmente a un proceso de secado a temperatura ambiente por 24 horas y condiciones de vacío en desecador por 24 horas adicionales. Los materiales obtenidos fueron denominados bajo el término “PHEA<sub>XX</sub>”, donde la nomenclatura “XX” indica el peso de la fracción de etanol en la solución monomérica.

#### *Elaboración de láminas de híbridos de PHEA-SÍLICE partiendo de PHEA con sus diversas porosidades.*

Para la selección de las condiciones para la elaboración de híbridos de PHEA-SÍLICE, ver detalles anexo A.

Los híbridos fueron preparados por medio de una reacción sol-gel usando como precursor de sílice, TEOS 98%, y ácido clorhídrico (HCl) al 10%, como catalizador. La solución consistió en una mezcla de TEOS:Agua:Etanol:HCl en relación molar 1:15:1:0.0185. Inicialmente, el TEOS se mezcló con agua y etanol bajo continua agitación durante 5 min, luego se adicionó el HCl diluido al 10% y posteriormente la solución final se agitó por 1 hora. Una vez listas, las membranas de PHEA micro y macroporosa fueron sumergidas en la solución del precursor dejando que se hincharan en una estufa de convección de aire a 40°C (tiempo que permitiera asegurar peso constante, ~24 horas). Al final de este tiempo, las muestras de los híbridos se sometieron a lavado con una mezcla de Agua:Etanol (15:1) para finalmente secarlas en vacío a 40°C a peso constante. Posteriormente, se sometieron a un lavado final por inmersión en agua purificada hasta que no se presentara cambio en el pH del agua. Los híbridos se denominaron usando la nomenclatura “PHEA<sub>XXSI</sub>”, donde “XX” tiene el mismo significado al usado en las muestras de PHEA puro y “SI” especifica la presencia de sílice en el material.

## 2.2. Caracterización de hidrogeles de PHEA e híbridos PHEA-SÍLICE

Los ensayos de caracterización en su mayoría fueron efectuados por quintuplicado, excepto los termobarridos que se realizaron por duplicado y los ensayos mecánicos y de bioactividad que se efectuaron por triplicado.

### 2.2.1. Composición de los híbridos

La determinación del contenido de sílice en los materiales híbridos fue realizada a través del cálculo de la diferencia de peso de las muestras antes y después de la reacción sol-gel. De igual manera el contenido de fase inorgánica se determinó a través del ensayo de pirólisis, efectuado en un horno tubular eléctrico (Gallur, Spain) a 850°C por dos horas en atmósfera normal; y a través de un análisis termogravimétrico (TGA), tal como lo indica el párrafo de análisis térmico (2.2.6.). Por medio del análisis termogravimétrico, se evalúa la cinética del proceso de descomposición de los materiales por efecto de la temperatura; y para los híbridos, la efectividad de la reacción sol-gel y la fracción de material inorgánico presente en la muestra (fase de sílice) a través del valor del residuo obtenido después del tratamiento térmico. En general el ensayo consiste en evaluar el cambio de la masa de una muestra en función de la temperatura o el tiempo, cuando se somete a un determinado programa de temperatura controlado. Generalmente, las pérdidas de material están asociadas a procesos tales como pérdida de agua y de componentes volátiles, y a la degradación de las estructuras químicas constituyentes del material.

### 2.2.2. Absorción de agua /Porosidad

Por medio de la determinación del contenido de agua absorbido en el equilibrio se puede estimar la porosidad en el estado hidratado de los hidrogeles y los híbridos, tomando como base de cálculo la Ecuación 8.

La absorción del agua en equilibrio se determinó por inmersión de las muestras secas en agua purificada a 37°C. Las cinéticas de absorción fueron medidas por pesada de las muestras a 1, 2, 8, 16 y 24 horas (tiempo final al cual las muestras de PHEA en sus diversas composiciones alcanzaban un estado de equilibrio evidenciado por un segmento de la curva aproximadamente paralelo al eje del tiempo). El contenido de agua en equilibrio, EWC, calculado se expresa como el peso de agua (g) absorbido a las 24 horas por 100 g de muestra seca.

Para el cálculo de la porosidad se toma como base que el hidrogel hidratado puede ser considerado como un sistema de dos fases: una fase formada por la red polimérica con agua absorbida ocupando un volumen,  $V_{polímero\ hidratado}$ ,  $V_{sp}$ ; mientras que la otra fase está formada por agua pura ocupando el volumen de los poros,  $V_{poros}$ . De esta forma puede ser

calculado el volumen de la fracción de poros en el hidrogel hidratado,  $\phi_{hidratado}$ , según la Ecuación 8:

$$\phi_{hidratado} = \frac{V_{poros}}{V_{poros} + V_{sp}} = \frac{v_{agua}(\omega - \omega_B)}{v_{sp}(1 + \omega_B) + v_{agua}(\omega - \omega_B)} \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde,  $\omega$ , es el agua absorbida por la muestra porosa después de estar inmersa en agua durante el tiempo de estabilización (medida adimensional);  $v_{agua}$ , es el volumen específico del agua pura ( $\text{cm}^3\text{g}^{-1}$ );  $v_{sp}$ , el volumen específico del hidrogel microporoso hidratado ( $\text{cm}^3\text{g}^{-1}$ ) y  $\omega_B$ , el agua absorbida por la muestra de PHEA0 o microporosa (medida adimensional).

Para calcular  $v_{sp}$  ( $\text{cm}^3\text{g}^{-1}$ ), se usó la Ecuación 9, asumiendo como cero el exceso de volumen en la mezcla polímero agua, y como valor de agua absorbida por el PHEA0 o no poroso ( $\omega_B$ ), un valor de 1,9.

$$v_{sp} = v_{agua} W_B + v_B(1 - W_B) \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde,  $v_B$ , es el volumen específico del PHEA0 seco (cuyo valor experimental fue de  $0.830 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$ ) y,  $W_B$ , es la fracción de masa de agua en la muestra de PHEA0 en el estado hidratado (adimensional), y que fue calculado como  $W_B = \omega_B / (1 + \omega_B)$ , donde  $\omega_B$  representa la fracción de agua absorbida por la muestra no porosa. El valor obtenido de  $W_B$ , fue de 0.66. De esta manera el resultado obtenido para  $v_{sp}$  fue de  $0.941 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$ .

### 2.2.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Para examinar la superficie y la sección transversal de las muestras que previamente fueron sometidas a hidratación en agua por 24 h con el fin de abrir los poros del hidrogel y de los híbridos, se usó un Microscopio Electrónico de Barrido Jeol JSM-5410 equipado con una criounidad Oxford CT 1500 empleando la técnica de liofilización (crioSEM). El agua se sublimó a  $-90^\circ\text{C}$  por 90 min. Las muestras se crio-fracturaron dentro del equipo y se recubrieron con una capa de oro. El voltaje de aceleración usado fue de 20 kV para tomar las imágenes. La homogeneidad de la distribución de la fase de sílice fue evaluada en la superficie y en la sección transversal por medio de Espectroscopía de Energía Dispersiva de rayos X, EDS (de Oxford Instruments). Para ello las muestras fueron previamente asperjadas y recubiertas con carbón usando para la determinación un voltaje de aceleración de 10 KV y una distancia de 15 mm. Se usó óxido de silicio como material de referencia estándar.

### 2.2.4. Microscopía de fuerza Atómica (AFM)

Este ensayo fue realizado en un NanoScope IIIa de Digital Instruments, operando bajo la modalidad de *tapping* en el aire. El *cantiléver* de silicio de Nanoworld fue usado con una fuerza constante de 2.8 N/m y una frecuencia nominal de resonancia de 92 a 95 kHz. La señal de fase se ajustó a cero a la frecuencia de resonancia de la punta. La frecuencia de *tapping* fue entre 5 a 10% más baja que la frecuencia de resonancia. La amplitud de conducción seguimiento fue de 3.0 a 4.0 V y la amplitud ajustada fue de 2.7 a 3.8 V.

### 2.2.5. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica es ampliamente aplicada para investigar uniones e interacciones de enlaces específicos. Cuando se trata de dos sustancias en fases distintas o fases separadas de componentes (sistemas de polímeros inmiscibles por ejemplo) se ve que no interactúan a nivel espectral (excepto probablemente en la interfase). En este caso, el espectro de la mezcla refleja la adición de los espectros infrarrojos de los dos componentes individuales. En el caso de materiales miscibles o parcialmente miscibles el espectro puede mostrar la formación de nuevas señales como resultado de la interacción de las dos estructuras o también puede darse la desaparición de alguna(s) bandas de los componentes individuales. Los desplazamientos de las bandas podrían dar información de los cambios que ocurran en los enlaces de un componente específico debido a enlaces entre componentes (Sionkowska 2011).

Los espectros FTIR se efectuaron en el rango entre 600 y 4000  $\text{cm}^{-1}$  con un Espectrómetro Nexus (Nicolet Instruments LTD, Warwick, UK) a temperatura ambiente usando las técnicas de Reflectancia Total Atenuada, ATR (para los films de PHEA) o Reflectancia Difusa, SDR (para el caso de algunos híbridos). Los espectros registrados de cada muestra son el resultado del promedio de 64 barridos. Se usó como sustancia de referencia, sílica gel 0.06-0.2 mm, de Scharlau.

### 2.2.6. Análisis Térmico: Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Termogravimetría (TGA)

Se realizaron termogramas DSC de calentamiento y enfriamiento en atmósfera de nitrógeno con muestras de los hidrogeles y los híbridos secas y húmedas en un DSC Mettler Toledo 823e (calibrado con indio y zinc), a una velocidad de 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . En las muestras secas se determinó la temperatura de transición vítrea,  $T_g$ , mientras que en las muestras hidratadas en equilibrio, fue calculada la fracción de agua cristizable. Los pesos de muestra usados estuvieron en el rango entre 5 y 10 mg. El flujo de calor en las muestras fue calculado con base en el calor de fusión del agua pura. El agua cristizable en la muestra fue determinado del pico de fusión del agua en el termograma de calentamiento.

La degradación térmica de las muestras de los geles de PHEA y los híbridos PHEA-SILICE por TGA fue realizada con muestras secas en un analizador SDT Q600 (TA Instruments, *United States*) bajo atmósfera de nitrógeno a un flujo de 50 mL/min y a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, iniciando desde 25-30°C y elevando la temperatura hasta 850°C. El peso de las muestras secas varió entre 5 y 15 mg y se usaron cápsulas de platino.

### 2.2.7. Ensayos Mecánicos

#### *Ensayo de Indentación*

Los ensayos mecánicos fueron realizados a temperatura ambiente usando muestras secas ( $\sim 5 \times 6 \times 1 \text{ mm}^3$ ) en un TMA Seiko Extar 7ss6000 (Seiko Instruments) en modo de indentación. Las rampas de fuerza se efectuaron a una velocidad de 0.005–0.05 N/min para las membranas de PHEA y 0.5–2.0 N/min para los híbridos; con un indentador circular plano de  $0.785 \text{ mm}^2$ , hasta alcanzar una penetración en el material de al menos 45  $\mu\text{m}$  en cada una de las muestras de hidrogel y de híbridos. El coeficiente de Poisson,  $\nu$ , se determinó con una muestra de forma prismática a través de la aplicación de un experimento de tensión. Mediante una simulación de elementos finitos y asumiendo una deformación isótropa de la sección transversal de la muestra se determinó que en promedio el valor de  $\nu$  es de 0.4. Con este valor se calculó la *Compliance*, a partir de las curvas de fuerza-penetración.

#### *Análisis Dinámico Mecánico (DMTA)*

Los ensayos de DMTA se realizaron en un Analizador Seiko DMS210 en modo de tensión a 1 Hz, usando muestras prismáticas de  $\sim 16 \times 6 \times 1.3 \text{ mm}^3$  de PHEA0SI. La historia térmica del experimento involucra un calentamiento a 1°C/min entre 25-120°C, seguido de una isoterma de 20 min y un barrido de enfriamiento a 1°C/min hasta 25 °C.

### 2.2.8. Ensayo de Bioactividad

El Fluido Corporal Simulado (SBF) se preparó con las siguientes concentraciones iónicas: 142.0 mM de  $\text{Na}^+$ , 5.0 mM de  $\text{K}^+$ , 2.5 mM de  $\text{Ca}^{+2}$ , 1.5 mM de  $\text{Mg}^{+2}$ , 148.8 mM de  $\text{Cl}^-$ , 4.2 mM de  $\text{HCO}_3^{-1}$ , 1.0 mM de  $\text{HPO}_4^{-2}$  y 0.5 mM de  $\text{SO}_4^{-2}$ ; el pH ajustado fue de 7.4 (Vallés 2008).

Las porciones de muestras secas de hidrogeles e híbridos de  $\sim 6 \times 6 \times 1 \text{ mm}^3$ , previamente pesados se sumergieron en aproximadamente 3 mL de SBF, suspendiéndolos en el centro del recipiente por medio de un alambre recubierto de aislante, para luego introducirlos en una estufa de convección de aire a 37°C. La solución de SBF se renovó para cada uno de los frascos de muestras después de tres días. Luego de 7 días, la mitad de las muestras fueron lavadas cuidadosamente con agua, se sometieron a secado en condiciones ambientales por 24 horas y luego en desecadores a vacío a temperatura ambiente. Las

muestras remanentes fueron sumergidas en un volumen similar de SBF\*2 (doble concentración iónica) y fueron de nuevo almacenadas por una semana adicional a la misma condición de temperatura que la semana anterior. La solución SBF\*2 se renovó en el día diez. El día 14 las muestras fueron lavadas y sometidas a secado. Se tomó el peso final de las mismas y se evaluó la morfología por SEM y la composición de la capa de apatita por EDS.

## **2.3. Elaboración de membranas y *scaffolds* de PCL y sus *composites***

### **2.3.1. Materiales/ Equipos**

#### *Elaboración de membranas de PCL*

Reactivos: Policaprolactona en pellets PM =70,000-90,000 (GPC), de Aldrich; 1,4-Dioxano, grado reactivo, estabilizado con 2.5 ppm de BHT, de Scharlab; Etanol absoluto grado síntesis, de Scharlab; Nitrógeno líquido en Dewar.

Equipos: Placa de agitación magnética, cabina de extracción, balanza con sensibilidad al 0.01 gramo, sistema de refrigeración y congelación, cristizador en Politetrafluoroetileno (PTFE), recipientes en poliestireno expandido, para contener el nitrógeno líquido.

#### *Elaboración de Scaffolds de PCL*

Reactivos: Policaprolactona en pellets PM =70,000-90,000 (GPC), de Aldrich; Elvacite 2043 PM= 50 kDa (polietilmetacrilato de bajo peso molecular, mezcla de PEMA (polietilmetacrilato) y PMMA ( polimetilmetacrilato)) en microesferas tamaño promedio de 200 micras, de Lucite International; 1,4-Dioxano, grado reactivo, estabilizado con 2.5 ppm de BHT, de Scharlab; Etanol absoluto grado síntesis, de Scharlab; Nitrógeno líquido en Dewar.

Equipos: Placa de agitación magnética, cabina de extracción, balanza con sensibilidad al 0.01 gramo, sistema de refrigeración y congelación, cristizador en Politetrafluoroetileno (PTFE), recipientes en poliestireno expandido, para contener el nitrógeno líquido y estufa de convección de aire a 37°C.

### *Elaboración de composites de PCL-SÍLICE*

Reactivos: Membranas de diversas porosidades / *Scaffolds* de PCL, Tetraetilortosilano o Tetraetilortosilicato o Tetraetoxisilano (TEOS) grado reactivo al 98%, de Sigma-Aldrich; Hidróxido de Amonio (NH<sub>4</sub>OH) grado reactivo al 25%, de Scharlab; Agua purificada; Etanol absoluto grado síntesis, de Scharlab. Estos reactivos se usaron tal como llegaron procedentes del distribuidor. Se usó además Ácido Clorhídrico (HCl) al 37%, de Scharlab, el cual se diluyó con agua purificada para obtener una solución al 10% m/m.

Equipos: Cabina de extracción, bomba de vacío, sistema acoplado con contenedor de muestras, dispensador de solución y conexión a línea de vacío (Figura 4), balanza con sensibilidad al 0.01 gramo, micropipetas 20-100 y 100-1000 microlitros, recipientes de vidrio, placa de agitación, estufa de convección de aire a 40°C.

### *Elaboración de composites de PCL-QUITOSANO-GPTMS-SÍLICE*

Reactivos: Membranas PCL10; Tetraetilortosilano o tetraetoxisilano (TEOS) grado reactivo al 98%, de Sigma-Aldrich; Quitosano de bajo peso molecular, de Sigma-Aldrich; 3-Glicidiloxipropiltrimetoxisilano (GPTMS) grado reactivo >98%, de Sigma-Aldrich; Agua purificada; Etanol absoluto grado síntesis, de Scharlab. Estos reactivos se usaron tal como llegaron procedentes del distribuidor. Se usó además Ácido Acético (CH<sub>3</sub>COOH) grado reactivo al >98%, de Sigma-Aldrich; el cual se diluyó con agua purificada para obtener una solución al 2.0% m/m y Ácido Clorhídrico (HCl) (al 37% de Scharlab), el cual se diluyó con agua purificada para obtener una solución al 10% m/m.

Equipos: Cabina de extracción, Bomba de vacío, sistema acoplado con contenedor de muestras, dispensador de solución y adaptación a línea de vacío (Figura 4), balanza con sensibilidad al 0.01 gramo, micropipetas 20-100 y 100-1000 microlitros, recipientes de vidrio, placa de agitación, estufa de aire caliente a 40°C.

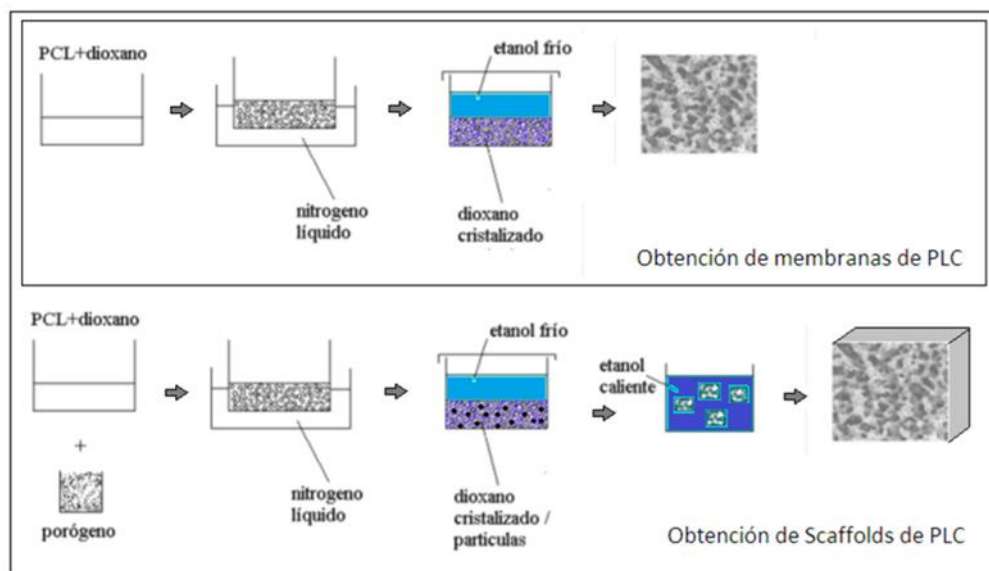
## **2.3.2. Métodos**

### *Elaboración de membranas de PCL con diversas porosidades y de scaffolds de PCL*

Para preparar las membranas de PCL se usó el método *freeze extraction* y una serie de soluciones de PCL con relaciones PCL en dioxano de 5, 10, 15 y 20% m/m. Una vez adicionado el dioxano a la cantidad de PCL correspondiente, las soluciones se someten a agitación continua a temperatura ambiente usando agitación magnética hasta observar disolución total. Una vez obtenida la disolución completa, se vierte en un cristizador de politetrafluoroetileno (PTFE) una cantidad suficiente de cada una de las soluciones de tal manera que permita obtener membranas de ~2 mm de espesor. El conjunto se somete rápidamente a inmersión en nitrógeno líquido hasta que la solución adquiriera un color blanco opaco. En este momento una porción de etanol previamente sometido a enfriamiento a -10°C se transfiere sobre la solución de PCL en dioxano congelada de tal forma que la cubra completamente; inmediatamente el recipiente que contiene la solución



congelada y cubierta con etanol absoluto se almacena en el congelador. Posteriormente, se le realizan varios cambios de etanol con el fin de eliminar el dioxano, usando siempre etanol frío, controlando que la temperatura sea lo más baja posible (menor o igual a  $-10^{\circ}\text{C}$ ) (Figura 3). Las membranas se secan hasta peso constante, en desecador usando vacío y temperatura ambiente (alrededor de 2 días). Finalmente se someten a cortado con el fin de tener muestras de tamaño y forma apropiadas para someterlas a tratamiento con solución de TEOS y para aplicar las técnicas de caracterización requeridas. Las membranas se denominaron como PCLXX donde “XX” indica el porcentaje en PCL en dioxano de la solución de la cual se partió para elaborar la membrana.

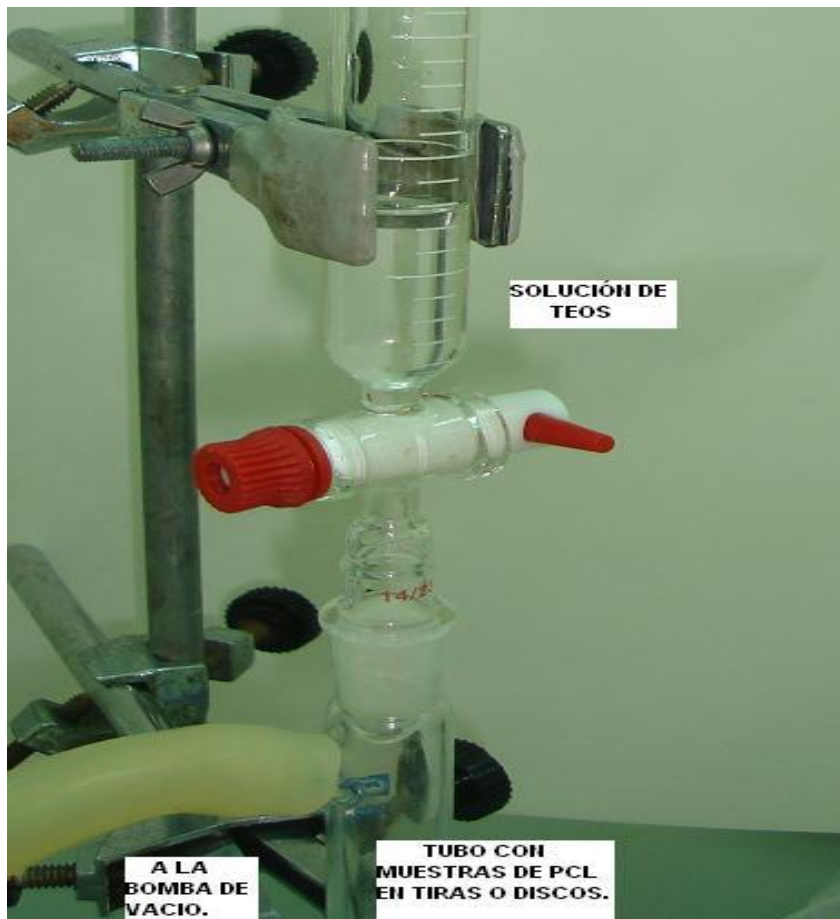


**Figura 3** Proceso para la preparación de membranas y de *scaffolds* de PCL (incorporación de porógeno), por el método *freeze extraction*.

Para preparar los *scaffolds* de PCL se usó una solución de policaprolactona en dioxano al 10% m/m y el método *freeze extraction*. Una vez obtenida la disolución completa de la PCL en el dioxano, se pesan las cantidades requeridas de porógeno y solución para obtener una relación porógeno: solución de PCL al 10% (0.75:1.0); y se mezclan en forma muy rápida en cristizador de Politetrafluoroetileno. Se continúa con el procedimiento como se indica en la preparación de las membranas desde “El conjunto se somete rápidamente a inmersión en nitrógeno”...hasta “...controlando que la temperatura sea lo más baja posible (menor o igual a  $-10^{\circ}\text{C}$ )”. Los *scaffolds* se cortan y se someten a lavados con etanol a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ , y agitación suave hasta que al evaporar una porción de etanol usado en el lavado no se observe ningún residuo turbio correspondiente al porógeno usado. Finalmente los *scaffolds* se secan en desecador al vacío a temperatura ambiente hasta peso constante (Figura 3). Los *scaffolds* se denominaron como PCL10<sub>scaff</sub>.

*Elaboración de composites por introducción de la fase de sílice en las membranas de PCL con diversas porosidades y en el scaffold.*

Los *composites* de PCL (*scaffold* /membrana ) se prepararon mediante una reacción sol-gel usando una solución de TEOS como precursor de sílice y ácido clorhídrico (HCl) al 10 %, o hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH) al 25%, como catalizadores. Para las *scaffolds* y membranas se usaron condiciones de catálisis ácida. La relación de reactantes TEOS: Agua: Alcohol Etilico: Ácido Clorhídrico (10% m/m) fue 1:2:1:0.0185. Con otra serie de membranas se usó catálisis básica empleando para ello una relación TEOS: Agua: Alcohol Etilico: Hidróxido de Amonio (25% m/m) igual a 1:2:1:0.138. Para preparar la solución de TEOS en medio ácido se mezclaron en su orden el TEOS, el etanol y el agua bajo agitación por 5 minutos, luego se adicionó el HCl 10% y se continuó con la agitación hasta completar 1 hora. En el caso de la solución catalizada con NH<sub>4</sub>OH, en el mismo orden de adición anterior se mezcló el TEOS, etanol y el agua, y se agitó por 30 min, pero el catalizador (NH<sub>4</sub>OH) se adicionó en el último minuto antes de verter la solución precursora sobre las membranas de PCL. Para la introducción de la soluciones precursoras de sílice, en las membranas y *scaffolds* de PCL, se usó un sistema de vacío (Figura 4) con el fin de facilitar la penetración de la solución precursora a través de los poros. Antes de verter las soluciones precursoras sobre las muestras (membranas / *scaffolds*), se aplicó 5 min de vacío al sistema, tiempo después del cual se adicionó la solución de TEOS y se dejaron en inmersión las muestras en la solución de TEOS por 15 min. Posteriormente, las muestras se retiran del tubo de muestras y se lavan con una mezcla etanol-agua (igual relación a la usada en la solución precursora) y se dejan reposo en cajas de Petri 14-18 horas a temperatura ambiente y luego 12 horas a 40 °C. Las muestras se secaron en desecador al vacío por 24 horas y se pesaron. Finalmente se sometieron a un lavado por inmersión en agua por 2-5 horas con agitación suave y continua, tiempo después del cual se dejaron secar en cabina de extracción en la noche, luego se colocaron en desecador al vacío para finalmente determinar su peso.



**Figura 4 Sistema al vacío usado para la introducción de solución de TEOS en las membranas/*scaffolds* de PCL.**

Los *composites* obtenidos de las membranas se designaron como PCLXXSIA o PCLXXSIB, donde “XX” tiene el mismo significado que se indicó antes, “SIA” indica la presencia de sílice por medio de catálisis ácida y “SIB”, indica la presencia de sílice por catálisis básica. Los *composites* de *scaffolds* se denominaron como PCL10SIA<sub>scaff.</sub>

#### *Elaboración de composites de PCL-QUITOSANO-GPTMS-SÍLICE*

Los *composites* de PCL con quitosano, GPTMS y sílice en membrana se prepararon a través del siguiente proceso: Se disolvió quitosano en ácido acético al 2% en agua, con el fin de obtener una concentración de quitosano al 1.5 % m/m en el ácido diluido. Para ello debió agitarse la solución durante 15 horas, la cual posteriormente se sometió a ultrasonido por 30 min y finalmente se pasó a través de filtro de nylon con diámetro de poro de 80  $\mu\text{m}$ .

De las 3 relaciones ensayadas y planteadas en el trabajo de fin de carrera de Sara Trujillo (Trujillo 2012, Trujillo *et al.* 2014 ) y de la pasantía de Marta Santos (Tabla 1) se seleccionó la relación molar Quitosano: Ácido Acético: GPTMS: TEOS: HCl (37%): H<sub>2</sub>O,

igual a 1: 8: 65: 21: 5.3: 1339, para preparar la solución precursora de sílice. Para el cálculo de la relación molar se tomó como base el peso molecular de una unidad monomérica del quitosano, y se planteó mantener la relación de GPTMS: TEOS, en la proporción 3:1 (Trujillo *et al.* 2014).

**Tabla 1.** Relaciones molares usadas para preparar membranas de PCL con quitosano, GPTMS y sílice, según lo reportado por Mahony *et al.* 2010 (Mahony *et al.* 2010, Trujillo 2012, Trujillo *et al.* 2014).

QUITOSANO	CH <sub>3</sub> COOH	GPTMS	TEOS	HCl (36%)	H <sub>2</sub> O
1	8	1.5	0.5	0.1	1138
1	8	15	5	1.2	1260
*1	8	65	21	5.3	1339

\* Relación molar seleccionada

La solución precursora de sílice, se preparó mezclando las cantidades calculadas, adicionando en su orden TEOS, agua y HCl, y agitando por una hora. Luego se mezcló con la solución de quitosano, a la que se le había adicionado la cantidad prevista de GPTMS y se había agitado por 14-15 horas; se continuó la agitación por una hora adicional. Para la introducción de la solución precursora de sílice, en las membranas de PCL, se usó el sistema de vacío anteriormente señalado (Figura 4) con el fin de facilitar su penetración en los poros. Antes de verter esta solución sobre las membranas de PCL se aplicó 5 min de vacío al sistema, tiempo después del cual se adicionó la solución precursora de sílice, dejando en inmersión las muestras en la solución por 15 min. Posteriormente, las membranas se retiran del tubo de muestras, se lavan con agua y se dejan en reposo en cajas de Petri por 7 días a temperatura ambiente y luego 5 días a 40 °C. Las muestras se secaron en desecador al vacío por 24 horas y se pesaron. Finalmente se sometieron a un lavado por inmersión en agua por 2-5 horas con agitación suave y continua, tiempo después del cual se dejaron secar en cabina de extracción durante una noche, se secaron al vacío y se determinó su peso final.

Los híbridos obtenidos de las membranas de PCL se designaron como PCLXC<sub>x</sub>G<sub>x</sub>T<sub>x</sub>, donde “X” tiene el mismo significado que se ha venido usando durante el desarrollo del documento, y “x” expresa la relación molar final en su orden de C (Quitosano), G (GPTMS) y de T (TEOS).

## 2.4. Caracterización de las membranas y *scaffolds* de PCL y sus *composites* PCL-SÍLICE obtenidos

### 2.4.1. Porosidad de las membranas (y *scaffolds*) de PCL y de los híbridos

Para cada material, a través de la aplicación del método gravimétrico, se realizaron al menos tres medidas para obtener la porosidad promedio. Para ello las muestras secas fueron previamente inmersas en etanol bajo aplicación de vacío para someterlas a pesada posterior teniendo precaución de remover el exceso de etanol (realizando el experimento lo más rápido posible). La porosidad fue entonces determinada mediante el cálculo de la relación de volumen de poros al volumen total de la membrana (Ecuación 10), asumiendo como despreciable la cantidad de etanol absorbido por la masa del material. La diferencia entre el peso seco ( $\mathcal{W}_{seco}$ ) y peso húmedo ( $\mathcal{W}_{húmedo}$ ), dividido por la densidad del etanol ( $\rho_{etanol}$ ) como se observa en la Ecuación 11, permite deducir el volumen de poros,  $V_{poros}$ , ya que es igual al volumen ocupado por el etanol absorbido. El volumen ocupado por el polímero,  $V_{polímero}$ , fue calculado del peso seco de la membrana dividido por el valor de la densidad teórica del PCL ( $1.145 \text{ g/cm}^3$ ) (Ecuación 12). De forma similar, para los *composites*,  $V_{hibrido/comp}$  se calculó según la Ecuación 13, en concordancia con el valor del contenido de sílice en el *composite*, determinado a través del incremento de peso y el valor teórico de  $\rho_{polímero}$  y  $\rho_{silice}$  ( $1.145$  y  $2.634$  respectivamente) (Lebourg *et al.* 2008a).

$$Porosidad (\phi) = \frac{V_{poros}}{V_{poros} + V_{polímero}} \quad \text{Ecuación 10}$$

$$V_{poros} = \frac{\mathcal{W}_{húmedo} - \mathcal{W}_{seco}}{\rho_{etanol}} \quad \text{Ecuación 11}$$

$$V_{polímero}(\text{membrana o scaffold}) = \frac{\mathcal{W}_{seco}}{\rho_{polímero}} \quad \text{Ecuación 12}$$

$$V_{hibrido/comp} = \frac{\mathcal{W}_{seco}}{\rho_{hibrido/comp}} \quad \text{Ecuación 13}$$

$$\text{Porosidad } (\phi) = \frac{(W_{\text{seco}} - W_{\text{húmedo}}) / \rho_{\text{etanol}}}{(W_{\text{húmedo}} - W_{\text{seco}}) / \rho_{\text{etanol}} + W_{\text{seco membrana}} / \rho_{\text{polímero}}} \quad \text{Ecuación 14}$$

### 2.4.2. Composición del híbrido en fase inorgánica

El contenido de sílice se determina en los *composites* por pesada de las muestras secas antes y después de la reacción sol-gel. Adicionalmente esta determinación se realizó a través de la medida del residuo inorgánico después del tratamiento de pirólisis calentando hasta 850°C (en atmósfera con oxígeno); y a través del ensayo termogravimétrico (TGA).

### 2.4.3. Propiedades hidrofílicas: Absorción de agua y ángulo de contacto

La absorción de agua fue medida después de 24 horas y 48 horas por inmersión de las membranas de PCL puro y los *composites*, en agua purificada a temperatura ambiente. El ángulo de contacto se determinó para PCL puro en membrana y *scaffold*, y para *composites*, en un equipo Data Physics OCA 20 con un sistema de análisis de imagen SCA20, usando 3  $\mu\text{L}$  de agua purificada como líquido de ensayo.

### 2.4.4. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología de las superficies y secciones transversales de membranas y *composites* se evaluó por medio de Microscopía Electrónica de Barrido, usando un equipo Jeol JSM-5410 (realizando una crio-fractura después de introducir las en nitrógeno, en el caso del análisis de la sección transversal). Las porciones de las muestras se montaron en un soporte de cobre, se asperjaron con una capa de oro y se tomaron microfotografías a un voltaje de aceleración de 10 kV.

Para verificar la distribución homogénea de la fase de sílice en los *composites*, luego de ser asperjados con carbón se realizó un análisis de Espectroscopía de Energía Dispersiva de rayos X, EDS (de Oxford Instruments), tanto en la superficie como en la sección transversal de las muestras; usando para ello un voltaje de aceleración de 10 kV, una distancia de 15 mm y sílice como patrón estándar.

### 2.4.5. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR fueron efectuados en el rango entre 600 y 4000  $\text{cm}^{-1}$  con un Espectrómetro Nexus (Nicolet Instruments LTD, Warwick, UK) a temperatura ambiente usando las técnicas de Reflectancia Total Atenuada, ATR, y Reflectancia Difusa, SDR; empleando como sustancia patrón  $\text{SiO}_2$  (sílica gel 0.06-0.2 mm, de Scharlau). Los espectros son el resultado del promedio de 64 barridos para cada muestra.

### 2.4.6. Análisis Térmico: Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Termogravimetría (TGA)

Se realizaron por duplicado barridos de calentamiento en DSC en el rango de  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta  $80^{\circ}\text{C}$ , después de un enfriamiento desde la temperatura ambiente hasta  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se usó para ello un equipo DSC Mettler Toledo 823e (calibrado con indio y zinc), usando una velocidad de barrido de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , en atmósfera de nitrógeno y cantidades de muestra entre 3 y 6 mg.

La degradación térmica (TGA) de las muestras de PCL puro y de los *composites* con sílice fue realizado con muestras que variaron entre 5 y 15 mg en cápsulas de platino; aplicando un barrido de calentamiento a una velocidad de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , en atmósfera de nitrógeno a un flujo de  $50\text{ mL}/\text{min}$ ; iniciando desde  $25\text{-}30^{\circ}\text{C}$  y elevando la temperatura hasta  $850^{\circ}\text{C}$  en un analizador termogravimétrico SDT Q600, TA Instruments, *United States*.

### 2.4.7. Ensayos Mecánicos

#### *Ensayo de Indentación*

Usando membranas puras de PCL y *composites* secas de aproximadamente  $5\times 6\times 1\text{ mm}^3$  en un equipo de TMA Seiko Extar 7ss6000 con un indentador plano circular de área  $0.785\text{ mm}^2$  (Seiko Instruments), a temperatura ambiente y por triplicado, se aplicaron sobre las muestras rampas de fuerzas de alrededor de  $0.07\text{ N}/\text{min}$  para membranas de PCL y  $0.01$  a  $0.07\text{ N}/\text{min}$  en el caso de los *composites*. La *Compliance J(t)* se evaluó al tiempo correspondiente a una penetración de  $100\text{ }\mu\text{m}$  en cada muestra.

#### *Ensayo Termodinámico Mecánico (DMTA)*

Las medidas dinámico mecánicas se efectuaron en un equipo Analizador Seiko DMS210 en modo tensión usando muestras secas en forma prismáticas de alrededor de  $10\times 5\times 1.4\text{ mm}^3$  de PCL15, PCL15SIA y PCL15SIB. Posterior a una isoterma de 10 min a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se aplicó un barrido de calentamiento a  $1\text{ Hz}$  y  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  entre  $-80$  y  $50^{\circ}\text{C}$ .

#### *Análisis en Microtest*

Estos ensayos mecánicos se realizaron usando un equipo MICROTTEST SCM3000 95, con una precisión  $1\text{ }\mu\text{m}$  y  $1\text{ mN}$ , y una fuerza máxima de  $15\text{ N}$ . Los ensayos fueron efectuados a una fuerza de máxima de  $10\text{ N}$ , a temperatura ambiente y con muestras secas de aproximadamente  $5\times 6\times 1\text{ mm}^3$ , en modo tensión. La deformación se determinó por aplicación de rampas de fuerza a una velocidad de  $0.005$  a  $0.05\text{ N}/\text{min}$  para las membranas puras de PCL y de  $0.5$  a  $2.0\text{ N}/\text{min}$  para los *composites* correspondientes.

### 2.4.8. Ensayo de Bioactividad

Muestras de PCL puro y *composites* de PCL secas y de aproximadamente  $6 \times 6 \times 1 \text{ mm}^3$  (las cuales fueron previamente pesadas) se colocaron en inmersión en cerca de 3 mL de Fluido Biológico Simulado (SBF); suspendiéndolas en el centro del recipiente por medio de un alambre con recubrimiento aislante y se sometieron a incubación a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . El SBF se preparó en concordancia con la solución propuesta por el ensayo de Kokubo, usando las siguientes concentraciones de iones: 142 mM de  $\text{Na}^+$ , 5.0 mM de  $\text{K}^+$ , 2.5 mM de  $\text{Ca}^{+2}$ , 1.5 mM de  $\text{Mg}^{+2}$ , 148.8 mM de  $\text{Cl}^-$ , 4.2 mM de  $\text{HCO}_3^-$ , 1.0 mM de  $\text{HPO}_4^{-2}$  y 0.5 mM de  $\text{SO}_4^{-2}$ ; pH de 7.4 (Vallés 2008). La solución de SBF se renovó en el día 3, y en el día 7 de incubación la mitad de las muestras fueron lavadas suavemente con agua purificada y sometidas a secado a temperatura ambiente por 24 horas en desecador a vacío. A las muestras restantes se les adicionó un volumen similar de solución SBF\*2 (que contiene el doble de la concentración de los iones) con el fin de reemplazar la solución inicial de SBF y se mantuvieron en las condiciones de incubación por una semana adicional. La solución SBF\*2 de igual forma se renovó en el día 10 y el día 14 fueron lavadas y sometidas a secado como se indicó para la primera semana. Se determinó para cada muestra su peso final y se evaluó su morfología por SEM, y por EDS se determinó la composición de la capa de apatita que se encontrara en la superficie de la muestra.



# **CAPÍTULO 3. Resultados y Discusión de Resultados**

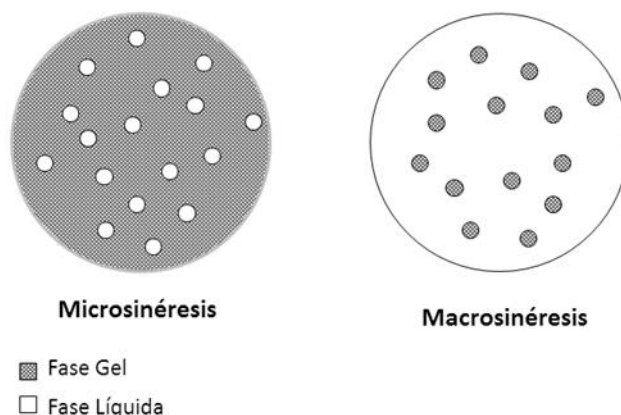
## **3.1 Obtención de membranas de PHEA con diversas porosidades y de híbridos PHEA-SÍLICE**

La selección del poli(2-hidroxietil acrilato) (PHEA) como hidrogel de partida se basó además de sus propiedades como biomaterial, en que ha sido un hidrogel ampliamente estudiado en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la UPV (Castilla *et al.* 2001, Gallego *et al.* 1998, Gallego *et al.* 2004, Gallego *et al.* 2007, Monleón *et al.* 2001, Salmerón *et al.* 2004, Salmerón *et al.* 2004, Serrano *et al.* 2004, Serrano *et al.* 2007); razón por la cual se consideró un componente orgánico ideal para obtener un material híbrido introduciendo una fase inorgánica de sílice mediante una reacción sol-gel en medio ácido, con TEOS como precursor.

El PHEA en sus diversas porosidades fue obtenido a través de una polimerización por radicales libres usando un 1% de EGDMA como entrecruzante. Se trata de una polimerización en solución es decir en una única fase homogénea, en la cual todos los constituyentes (monómeros, iniciadores, etc.) son solubles en el medio de polimerización. Cuando hay solvente presente durante el entrecruzamiento de la red polimérica en cantidad mayor a la de equilibrio, entonces el solvente exuda del gel (proceso denominado sinéresis). Si el entrecruzamiento atrapa solvente en el gel, se pueden formar poros ricos en solvente dentro del gel (microsinéresis). Si la fase rica en solvente se presenta como fase minoritaria, se producirá un material poroso de la fase rica en monómero percolada, con los poros formados por la fase rica en solvente. La gelificación es por sí misma una forma de separación de fases, en donde la fase exterior al gel se asume que no dispone de polímero (potencial químico con respecto al polímero es cero), y que la cantidad de solvente en el gel hidratado cuando el gel se encuentra en estado de equilibrio en la fase de gel, presenta un potencial químico también de cero.

La separación de fase tiene lugar cuando la red de polímero que va creciendo durante la polimerización, no puede ya mezclarse homogéneamente con la cantidad de solvente presente. Si la fase rica en monómero existe como gotas discretas y la fase rica en solvente es la fase continua, la polimerización ocurre en fase heterogénea; esto es una fase rica en monómero suspendida en una fase rica en solvente denominada fase continua (ya que su volumen llega a ser más alto al de la fase rica en monómero). La sinéresis ocurre dentro de la fase de gel y bajo condiciones que propician la precipitación de la polimerización y la formación de partículas de polímero. Como se observa en la Figura 5, esta separación de fases puede llevar a la dispersión de partículas de polímero dentro de la fase líquida formada por el solvente y el monómero remanente, fenómeno denominado *macrosinéresis*. Si la dispersión del solvente ocurre dentro de una fase de polímero hidratado, la formación de los poros ocurre por un mecanismo diferente, el cual se denomina *microsinéresis*.

Por tanto dependiendo de factores tales como concentración de diluyente, conversión completa o no del polímero y de si el solvente es extraído, el resultado es una esponja polimérica consistente de micro esferas de polímero adheridas (macrosinéresis) o a una matriz polimérica porosa (microsinéresis).



**Figura 5 Representación de la estructura obtenida por micro y macrosinéresis.**

En los hidrogeles poliméricos que pueden formarse por microsinéresis durante la polimerización en solución; la cantidad y tamaño de poros dependen de la cantidad de solvente usado, de la solubilidad de la red de polímero, de los monómeros, del solvente y de la densidad de entrecruzamiento de la red polimérica. Es así que se ha encontrado que cuando se usa etanol como solvente se producen materiales con mayores volúmenes específicos en el estado seco, lo que indica que los poros colapsan en este estado debido a la contracción de la red. Para nuestro caso, el crecimiento de la estructura del hidrogel PHEA en la polimerización del HEA al ser diluido con porciones de etanol produjo una separación de fases creciente entre la red y la fase líquida que contiene etanol y el

monómero, que no ha reaccionado. Al final de la reacción, cuando la muestra es lavada con agua, el agua sustituye el etanol que hincha el polímero y llena así los poros.

Como antecedentes, cabe resaltar que un buen número de estudios en el grupo de investigación ha involucrado la preparación y caracterización de nanocomposites polímero-sílice, basado en PHEA preparado por polimerización simultánea de la fase orgánica y la inorgánica a través de síntesis sol-gel usando TEOS como precursor de la sílice.

Cuando la estructura de este sistema fue estudiado por AFM se encontró que los híbridos dependen marcadamente de la relación sílice a polímero en el sistema: Si esta relación es menor de 0.15, el híbrido consistía en agregados de partículas de sílice dispersas en la matriz orgánica; cuando es más alta, la estructura de la sílice y la matriz orgánica se presentan como una fase co-continua (Rodríguez *et al.* 2007). Los estudios de absorción de agua con un amplio rango de contenidos de sílice, por encima y por debajo del límite de percolación confirmaron la formación de una red inorgánica continua interpenetrada con la red orgánica (Pandis *et al.* 2011).

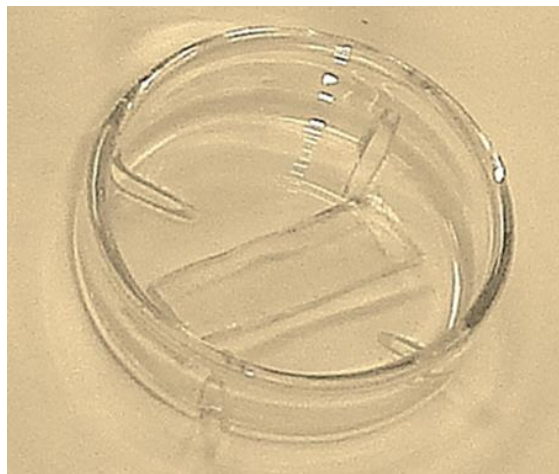
De otra parte, también se han preparado nano híbridos Poli (EMA-co-HEA)/SiO<sub>2</sub> producto de la copolimerización de EMA y HEA durante una reacción simultánea sol-gel catalizada en medio ácido; obteniendo contenidos de sílice incrementados (0–30 % m/m) con una distribución homogénea en la matriz polimérica, en forma de nano dominios ya sea dispersados o continuamente interpenetrados con la red orgánica (para contenidos mayores al 10%). En todos los casos la red de sílice refuerza mecánicamente la matriz orgánica y al mismo tiempo confiere bioactividad a la superficie (Vallés *et al.* 2010c).

En la misma dirección, algunos trabajos se han dirigido a obtener series de copolímeros híbridos preparados por polimerización y reacción sol-gel simultánea. Una primera serie de composición HEA/EA variable y un contenido fijo en sílice y una segunda serie con composición orgánica fija HEA/EA y varios porcentajes de sílice, permitiendo la caracterización en relación con el contenido de agua absorbido (Stathopoulos *et al.* 2010).

### 3.2. Síntesis *in situ* de la fase de sílice en los hidrogeles previamente sintetizados

Como ha sido anotado anteriormente, aprovechando la ventaja que presentan los hidrogeles de PHEA para absorber agua y etanol y por ende soluciones acuosas, fueron usadas una serie de láminas porosas de PHEA como estructura base para sintetizar la sílice. El método sol-gel aplicado con el fin de lograr la absorción *in situ* de la solución precursora de sílice en las membranas de PHEA con variedad de porosidades, permitió la obtención de híbridos con un contenido de sílice entre un ~20 y hasta un ~60% m/m, (Tabla 2), presentando una fase continua de sílice. Los nano híbridos presentan propiedades macroscópicas que varían desde hidrogeles suaves hasta materiales duros pero frágiles que se fracturaban fácilmente durante su manipulación. Vale aclarar que esta última fue la razón para que en algunos casos fuera necesario cambiar la técnica de caracterización o se requiriera hacer algunas modificaciones a la misma con el fin de realizar la evaluación de la muestra, o más aun en algunos momentos no fue posible la realización del ensayo.

En todos los casos, los híbridos obtenidos presentaron una alta transparencia (Figura 6), situación que se relaciona con un tamaño de partícula muy pequeño y que resulta como se esperaba del uso de una reacción de sol-gel catalizada en medio ácido (Castelvetto y De Vita 2004, Lin *et al.* 2008, Liu *et al.* 2007, Qin *et al.* 2007).



**Figura 6** Apariencia física del híbrido PHEA20SI.

**Tabla 2.** Propiedades físicas de los hidrogeles de PHEA puros y sus híbridos con sílice.

<i>MATERIAL</i>	<i>Contenido de Sílice (%)<sup>1</sup></i>	<i>Residuo de TGA (%)<sup>2</sup></i>	<i>Residuo de pirólisis (%)<sup>3</sup></i>	<i>Porosidad de la muestra hidratada (%)</i>	<i>EWC<sup>4</sup>/ 100 g de muestra<sup>5</sup></i>	<i>EWC / 100 g de PHEA<sup>6</sup></i>	<i>Compliance (*10 E-06) (m<sup>2</sup>/N)</i>
<i>PHEA0</i>	0	-	-	0	190±7	190±7	4.6± 0.22
<i>PHEA20</i>	0	-	-	24	274±8	274±8	7.1± 0.32
<i>PHEA30</i>	0	-	-	40	369±14	369±14	8.5± 0.63
<i>PHEA40</i>	0	-	-	51	474±25	474±25	9.4± 0.92
<i>PHEA50</i>	0	-	-	69	794±33	794±33	13± 0.56
<i>PHEA0SI</i>	21.7	18.8	19.6	-	86±3	109	1.40± 0.49
<i>PHEA20SI</i>	32.6	31.6	30.6	-	47±8	70	0.77± 0.04
<i>PHEA30SI</i>	41.1	42.5	38.1	-	27±1	46	0.19± 0.2
<i>PHEA40SI</i>	48.9	45.6	44.8	-	19±2	37	0.19± 0.03
<i>PHEA50SI</i>	58.8	54.5	52.4	-	12±4	30	-

<sup>1</sup> Calculado por cambio de peso<sup>2</sup> Atmósfera de N<sub>2</sub><sup>3</sup> Atmósfera de oxígeno<sup>4</sup> EWC: Contenido de agua en el equilibrio<sup>5</sup> Base seca<sup>6</sup> Base seca

### 3.3. Caracterización de las membranas de PHEA y de sus híbridos

#### 3.3.1. Absorción de agua /Porosidad

El contenido de agua de equilibrio (EWC), definido como los gramos de agua absorbidos/100 g de muestra seca fue determinado por diferencia de peso, después de la inmersión en agua purificada por 24 horas, tiempo después del cual se estabiliza la determinación de acuerdo a lo observado en los experimentos realizados y a lo reportado en trabajos previos con estudios en hidrogeles de PHEA (Monleón *et al.* 2001a, Monleón *et al.* 2001b).

Cuando se sumerge en agua, el hidrogel alcanza varias veces su peso (Figura 7). Tomando como ventaja que la porosidad se relaciona con el incremento del contenido de agua absorbido en el equilibrio, tal como lo demuestra la Tabla 2; se calcularon las porosidades de los hidrogeles determinando el volumen de poros en el estado hidratado de los hidrogeles puros (Serrano *et al.* 2004).

Así, el PHEA0, al ser sumergido en agua muestra una red polimérica con un contenido de agua absorbida en equilibrio de 190% medido en base seca (Tabla 2).

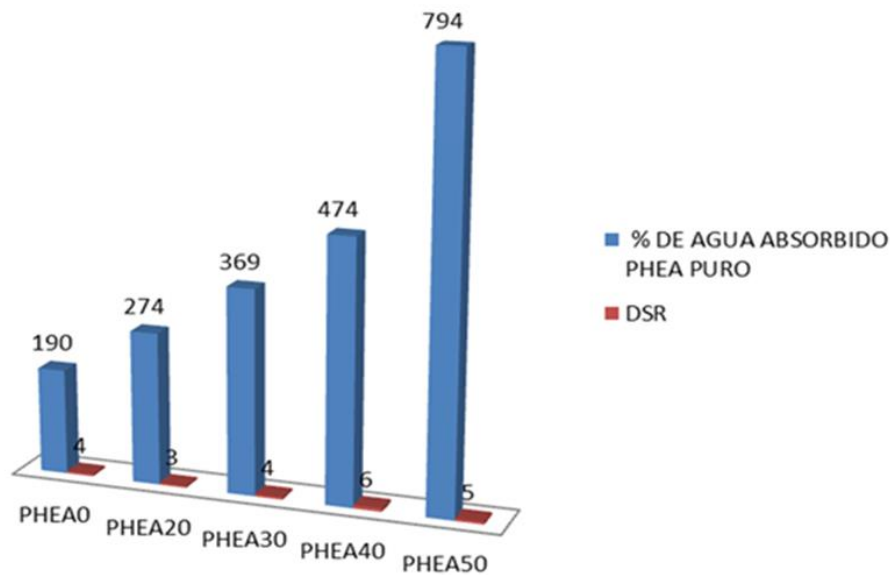
En la Tabla 2 se muestra que la adición de hasta 50% de etanol a la solución del monómero logra la obtención de hidrogeles con capacidad de absorber un contenido de agua en equilibrio hasta alrededor de 800% en peso medido en base seca, en la cual los poros ocupan un 69% del volumen de la muestra. El tamaño de poro también aumenta con la fracción de diluyente y tal como se ve en la imagen del crio-SEM en donde el poro es observado en la muestra hinchada (Figura 10), la estructura del poro varía en el rango de las dimensiones micrométricas.

En general, es evidente que EWC aumenta con la porosidad de las membranas de PHEA puro, y ella a su vez es producto de la cantidad de etanol usado en la polimerización.

La distribución de agua en el polímero hidratado se ha estudiado ampliamente en investigaciones anteriores mediante técnicas tales como la calorimetría y la espectroscopía

dieléctrica (Costantini *et al.* 2006, Pandis *et al.* 2011), permitiendo verificar que una primera capa de moléculas de agua se unen a las cadenas poliméricas a través de sitios de absorción y que se forman capas sucesivas en donde el agua mantiene sus propiedades físicas, incluyendo su capacidad de cristalizar y de fundir.

El alto contenido de agua en las muestras en equilibrio demuestra que los geles son altamente porosos. Es importante observar que cuando se seca la muestra del hidrogel, la estructura porosa colapsa, situación que es reversible por reinmersión en agua, que hace que los poros se reabran y el contenido de agua pueda llegar al estado de equilibrio.



**Figura 7** Absorción de agua de las membranas de PHEA con su desviación estándar relativa (DSR) para las diversas porosidades.

### 3.3.2. Síntesis de la fase inorgánica, contenido de sílice obtenido y su efecto en la absorción de agua

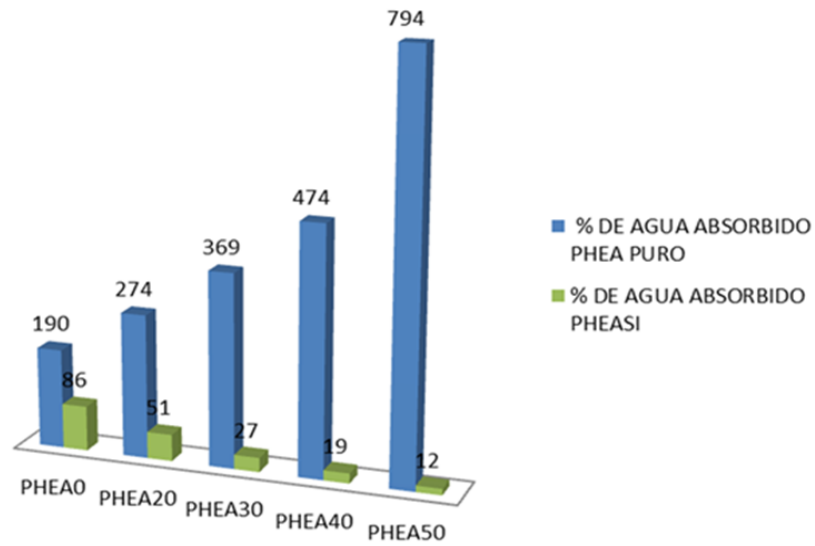
La cantidad de sílice en los materiales híbridos que se determinaron por diferencia de peso antes y después de la reacción sol-gel y se observan en la Tabla 2. Resulta evidente que el contenido de esta fase aumenta en forma directa con la porosidad del PHEA inicial obteniéndose valores desde 22% para el polímero microporoso denominado PHEA0SI hasta un valor de ~60 % m/m para el polímero con mayor porosidad, es decir el PHEA50SI.

El material denominado PHEA0SI presenta una capacidad de absorción de agua de alrededor del 86%, reduciendo la cantidad absorbida por peso de PHEA en el híbrido en un 43% m/m (cálculo realizado con los datos de la Tabla 2), lo que muestra que la fase

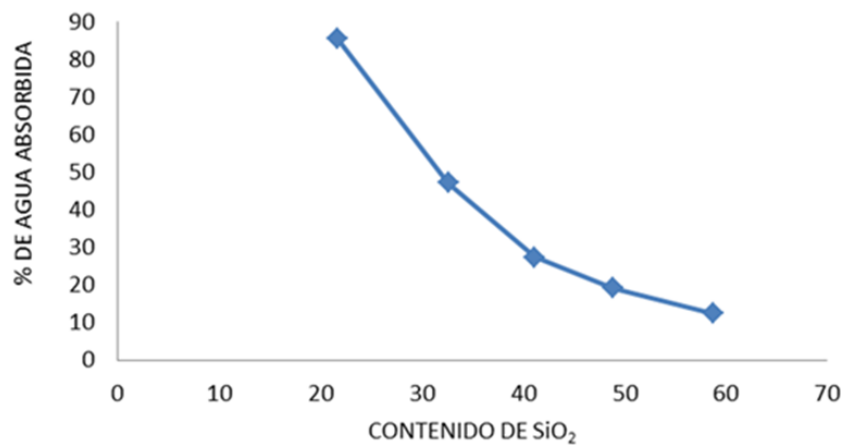
polimérica es aún bastante capaz de absorber volúmenes importantes de agua, y que la fase de sílice se encuentran en forma de partículas dispersas en la fase polimérica sin llegar a percolar. Esto hace pensar que no se alcanza a formar una red de sílice y como consecuencia se conserva en forma apreciable la capacidad de absorber agua e hincharse. Las condiciones seleccionadas para la reacción sol-gel (relación molar agua: TEOS, el uso de catálisis ácida y bajas temperaturas de envejecimiento y secado), conllevan a pensar que la conversión completa de los grupos orto silicato en sílice no fue alcanzado, y que por ende alguna cantidad de grupos silanoles sin reaccionar permanecen en la fase de sílice. Estos grupos pueden continuar reaccionando o pueden perderse por evaporación. Esta premisa puede soportarse por los resultados del análisis por TGA (atmósfera de nitrógeno) y pirólisis (atmósfera con oxígeno) que reportan valores más bajos a los calculados por diferencia de peso antes y después de la reacción sol-gel y como se verá más adelante por el hecho de que el módulo elástico de un híbrido medido en DMTA aumenta continuamente cuando la temperatura del barrido de calentamiento supera la temperatura de obtención de los híbridos. Es de resaltar que la capacidad de absorción de agua de los materiales de este trabajo es mayor que la de los híbridos preparados por polimerización simultánea que presentan el mismo contenido de sílice. Así, Rodríguez *et al.* (Rodríguez *et al.* 2008a) sintetizaron por polimerización simultánea un híbrido de PHEA-SILICE con ~20% de contenido de sílice que absorbe alrededor de un 75 % de agua; mientras que el obtenido en el presente trabajo y con un contenido de sílice similar absorbe alrededor de 109 % de agua. Este resultado puede indicar que la percolación de la fase de sílice ocurre a más altos contenidos de sílice cuando la reacción sol-gel ocurre en presencia de la red del hidrogel polimerizada. De hecho cuando la reacción sol-gel se inicia en una mezcla del precursor de sílice y el monómero de HEA, la reacción sol gel es más rápida que la polimerización (Rodríguez *et al.* 2007).

Sin embargo, al comparar los híbridos con sus correspondientes hidrogeles de partida es notorio que la absorción de agua disminuye en forma más marcada al aumentar el contenido de sílice obtenido, tal como lo muestra la Figura 8. Para el mayor contenido de sílice (PHEA50SI), la reducción en la absorción de agua por peso de polímero llega a ser del 96% (calculado a partir de los datos de la Tabla 2). En la Figura 9, se presenta la curva que se obtiene al relacionar la fracción de sílice en los materiales con la capacidad de absorción de agua en equilibrio.





**Figura 8** Efecto de la presencia de sílice en la absorción de agua de las membranas de PHEA.

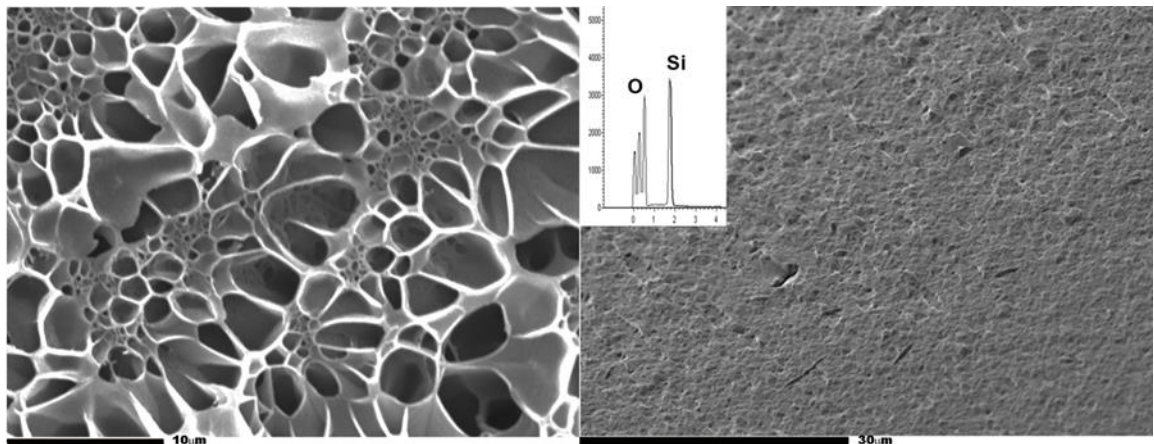


**Figura 9** La absorción de agua en función del contenido de sílice en los materiales híbridos PHEA-SILICE.

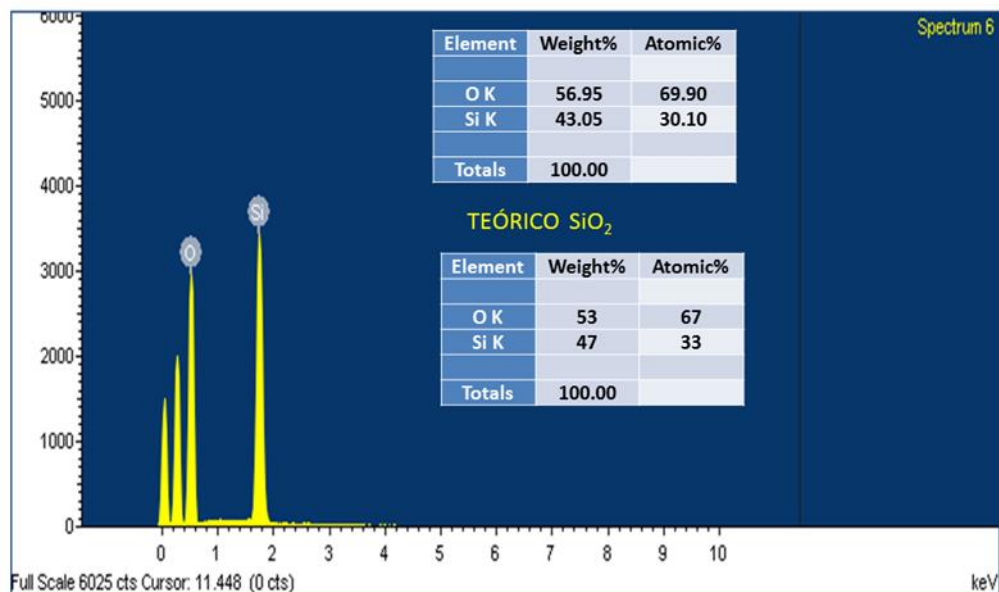
### 3.3.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

El análisis por SEM permite evaluar la morfología estructural de la muestra, obteniéndose imágenes producidas por los electrones emitidos cuando los electrones primarios que vienen de la fuente impactan la superficie y son inelásticamente dispersados por los átomos de la muestra. A través del uso de equipos que cuentan adicionalmente a la posibilidad de detectar los electrones emitidos, el detectar la energía de los rayos X producidos por la interacción de los electrones con la muestra (rayos X dispersados), se puede evaluar la presencia de los átomos de elementos individualmente, obtener los registros de espectros de los átomos presentes y realizar el mapeo de los átomos de interés correspondientes y así inferir la presencia de sílice en forma homogénea. Esta técnica es denominada EDS o EDX (Espectroscopia de energía de rayos X dispersados).

Las imágenes obtenidas por crio SEM permitieron verificar la estructura de los hidrogeles y de los materiales híbridos. La Figura 10 muestra la estructura porosa del PHEA con mayor porosidad. Los tamaños de poro observados están en el rango de alrededor de 5 micras cuando el hidrogel se encuentra hidratado en agua. En las secciones de los híbridos, los poros son mucho más difíciles de observar, encontrándose una apariencia lisa, como se observa en la Figura 10. Para verificar la distribución de la sílice en la muestra fueron tomados espectros tanto en la superficie (Figura 11) como de la sección transversal, encontrando así los picos de Si en diversos puntos de las muestras lo que permitió verificar la distribución de la sílice en forma homogénea (inserto de la Figura 10). La relación atómica oxígeno: silicio fue verificada, encontrándose que variaba entre 0.5:1.0 y 3.0:1.0, evidentemente en dependencia del punto en donde el espectro es tomado. Como valores de referencia se observa en la Figura 11 la relación obtenida para una muestra de óxido de silicio estándar.



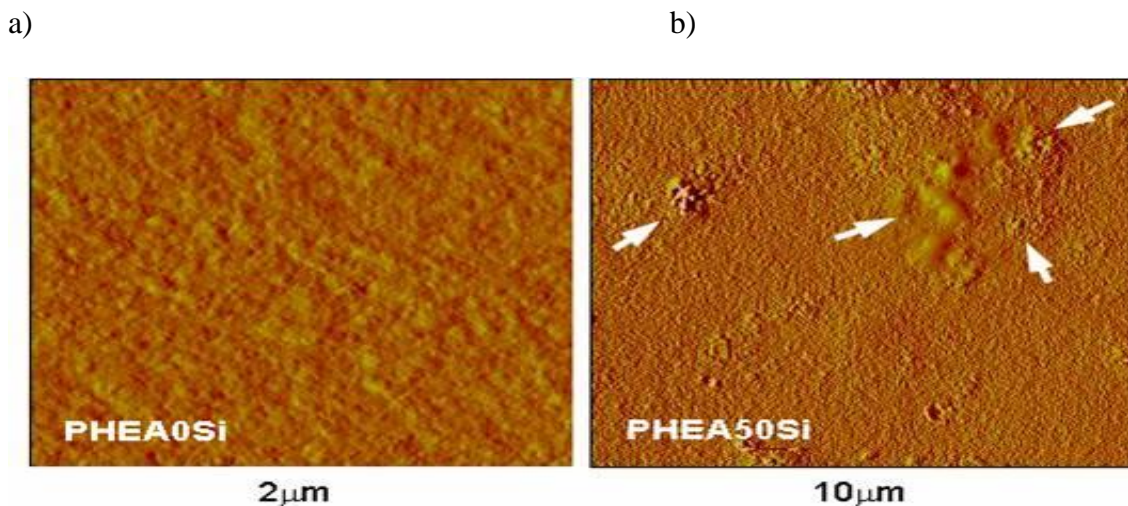
**Figura 10** Microfotografías en SEM del hidrogel PHEA50 y el correspondiente híbrido PHEA50SI. Tomada y traducida del original en Plazas *et al.* 2013.



**Figura 11** Espectro EDS tomado en superficie de una muestra de híbrido PHEA-SILICE. En inserto: Reporte del porcentaje en peso y atómico de los elementos presentes de una muestra y valor teórico para el óxido de silicio.

La Figura 12 presenta imágenes en amplitud de los materiales híbridos en AFM en sus secciones transversales. La Figura 12a muestra un escáner de 2  $\mu\text{m}$  x 2  $\mu\text{m}$  del material compuesto de PHEA0SI. Las pequeñas irregularidades superficiales demuestran la presencia de dominios nanométricos dispersos en el polímero, mientras que la Figura 12b, en un barrido de 10  $\mu\text{m}$  x 10  $\mu\text{m}$  del material compuesto preparado de un hidrogel poroso PHEA50, muestra la presencia de agregados del orden de los micrómetros adicionalmente a los dominios nanométricos.

Por tanto, fue verificado a través de los análisis por SEM y AFM que cuando la reacción sol-gel toma lugar en el hidrogel previamente polimerizado, la sílice se distribuye en forma de agregados de manera uniforme como lo demuestran las imágenes de SEM (Figura 10) y AFM (Figura 12). Adicionalmente se puede decir que en los materiales compuestos de mayor porosidad existe la fase nanométrica que se encuentra en el material microporoso PHEASI y que se presenta adicionalmente una fase consistente en agregados de tamaño micrométrico, permitiendo tener contenidos de sílice del orden de 60% en peso.



**Figura 12** Imágenes AFM en amplitud de secciones transversales de materiales híbridos. Área de barrido Figura a) : 2  $\mu\text{m}$  x 2  $\mu\text{m}$  de PHEA0SI. Área de barrido Figura b): 10  $\mu\text{m}$  x 10  $\mu\text{m}$  de PHEA50SI. Tomada y traducida del original en Plazas *et al.* 2013.

### 3.3.4. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier

Los espectros de absorción al infrarrojo de las láminas de PHEA y sus híbridos se pueden observar en la Figura 13. El espectro FTIR de la estructura química de PHEA (Figura 13a), está en concordancia con estudios previamente publicados ( Vargün 2003): La señal del grupo carbonilo característico (estiramiento de C=O) aparece a 1710-1720  $\text{cm}^{-1}$ . Entre 1298 y 1200  $\text{cm}^{-1}$ , se observan las señales debidas a flexión de O-H y estiramiento del C-O del pico del éster. Las señales correspondientes a estiramiento del C-H alifático están en el rango 2900-3000  $\text{cm}^{-1}$ , y el pico en el rango 1410-1450  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al grupo -CH<sub>2</sub>. Un pico amplio a aproximadamente 3500  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a estiramiento de enlaces O-H, mientras que la flexión del -H se encuentra a aproximadamente 1390  $\text{cm}^{-1}$ . Las señales a 1160-1180  $\text{cm}^{-1}$  corresponden de igual forma al grupo éster.

Para identificar la estructura química de compuestos polímero-sílice suelen ser muy utilizadas técnicas analíticas como FTIR y <sup>29</sup>SiNMR del estado sólido, sin embargo no se disponía de esta técnica en el desarrollo del presente trabajo. Por esta razón, adicionalmente al análisis por EDS, la formación de sílice en la estructura del hidrogel fue verificada por espectroscopia infrarroja (Figura 13a, 13b, 13c).

La espectrometría FTIR es también ampliamente usada para probar la formación de la red de sílice. En general, el pico más relevante se ubica alrededor de 1100  $\text{cm}^{-1}$ , el cual varía dependiendo de las muestras, en el rango 1000-1200  $\text{cm}^{-1}$  y es atribuido a vibraciones de estiramiento asimétricas de enlaces Si-O-Si de la sílice que suele encontrarse en los híbridos. Si la condensación no es completa los grupos Si-OH estarán igualmente

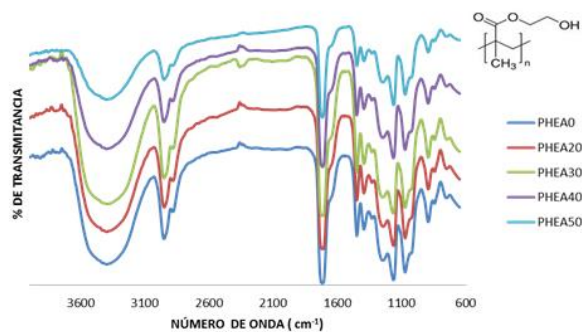
presentes. Las bandas de absorción características de los productos de hidrólisis de TEOS, sin tener en cuenta las del polímero son las de estiramiento Si-OH a  $882\text{ cm}^{-1}$ , así como las señales de las absorciones típicas para la red Si-O-Si a  $1130$  y  $823\text{ cm}^{-1}$ . Las bandas de absorción características de estiramiento asimétrico Si-O-Si ( $1130\text{ cm}^{-1}$ ) llegan a ser más intensas y se desplazan hacia longitudes de onda más altas ( $1180\text{ cm}^{-1}$ ) cuando hay redes de características de mayor condensación. Las uniones de hidrógeno entre el polímero y el silanol residual de la sílice en los híbridos podrían también ser visualizadas en algunos casos (Zou *et al.* 2008).

El espectro de los materiales compuestos PHEA-SILICE, permitió identificar la señal característica del grupo carbonilo a  $1710\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ . Adicionalmente, las señales a  $973\text{ cm}^{-1}$  y  $798\text{ cm}^{-1}$  se relacionan con los enlaces de los grupos Si-OH y la señal a  $1074\text{ cm}^{-1}$ , a Si-O-Si; confirmando la presencia de las estructuras correspondientes a la sílice en los materiales compuestos.

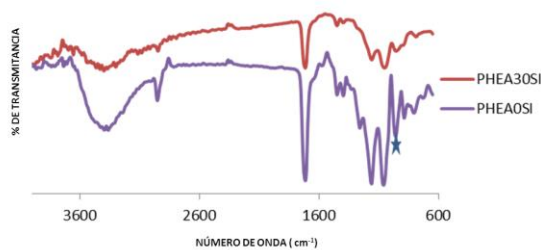
En general, en el pico presente en los espectros de los hidrogeles puros a alrededor de  $\sim 3500\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a un enlace O-H, se observa una tendencia a disminuir en intensidad con al aumento del contenido de sílice; tal como lo muestra la Figura 13b. Las señales que muestran evidencia de enlaces C-Si no fueron encontrados en ningún caso.

El espectro de óxido de silicio (reactivo analítico) se efectuó como sustancia de referencia y se observa en el espectro de la Figura 13c. Al comparar la sílice de referencia con los espectros obtenidos para los materiales compuestos se pueden evidenciar que las señales deben aparecer en superposición con las de los grupos funcionales del hidrogel de PHEA y además es posible que ocurran algunas desviaciones de las señales. Sin embargo la comparación permitió evidenciar la presencia de tres señales significativas: las de Si-O-Si, Si-OH y Si-O (Zou *et al.* 2008).

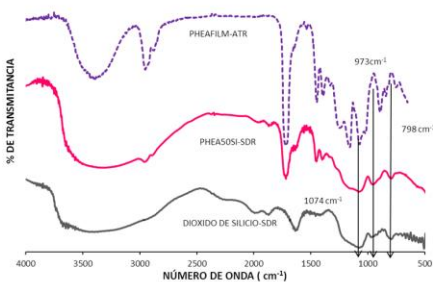
a)



b)



c)



**Figura 13** Espectros FTIR - ATR a) Para los films de los hidrogeles de diversas porosidades, b) Para los híbridos PHEA0SI y PHEA30SI. c) Para el hidrogel de PHEA en comparación con el FTIR-SDR del híbrido PHEA50SI . Los espectros han

sido desplazados en el eje Y para facilitar su entendimiento. Tomada y traducida del original en Plazas *et al.* 2013.

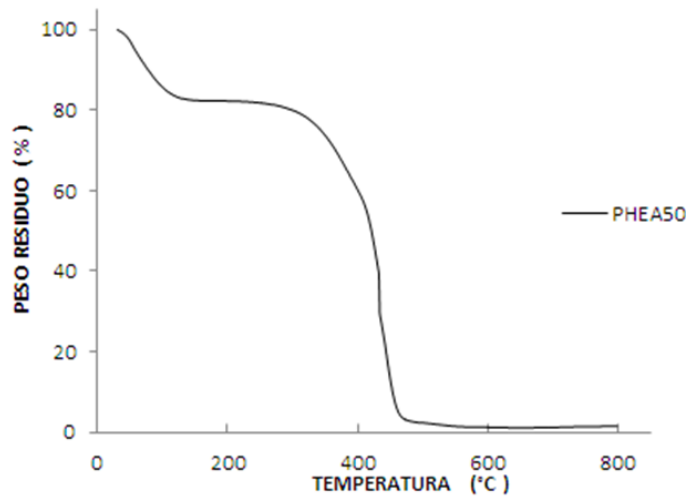
### 3.3.5. Caracterización Térmica (TGA, DSC y DMTA)

El análisis por TGA permite evaluar además de la estabilidad térmica, el límite de degradación y el porcentaje de sílice incorporado en la matriz polimérica.

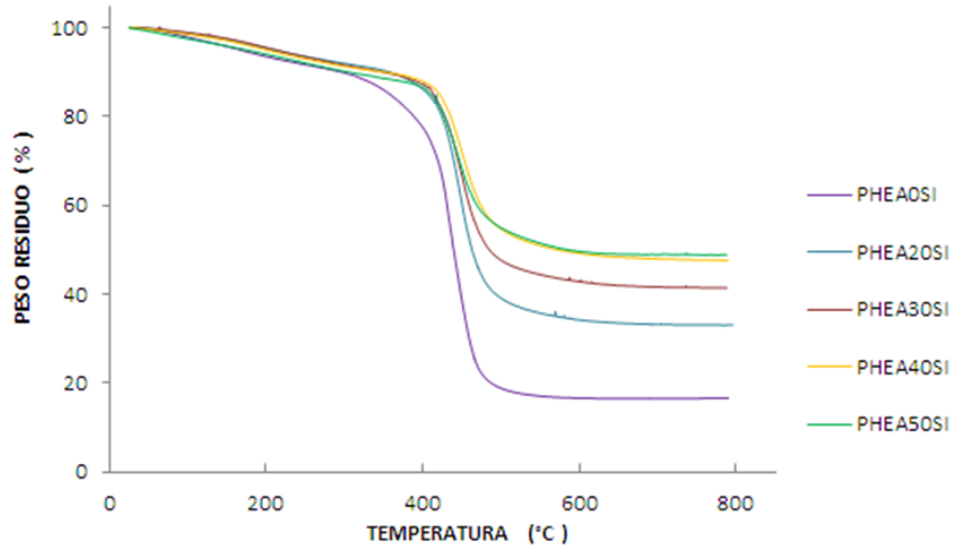
#### *Análisis Termo Gravimétrico*

La Figura 14 presenta la curva de degradación térmica de un hidrogel, en este caso de PHEA50 (son básicamente similares entre sí para las diferentes porosidades).

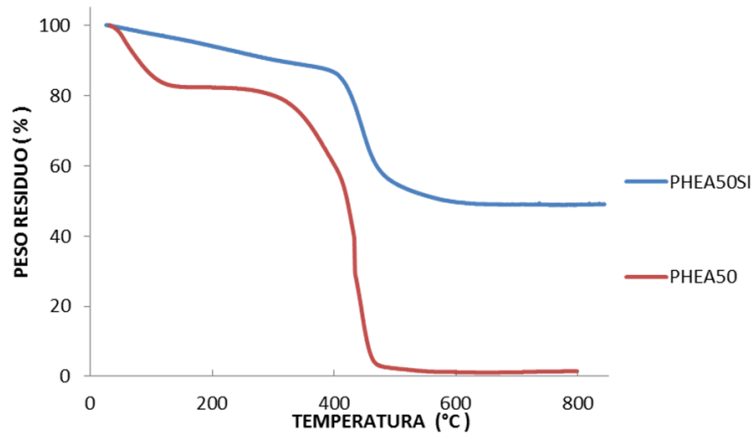
La masa residual en el análisis termo gravimétrico de las series de híbridos PHEA0SI hasta PHEA50SI permite establecer que la cantidad de fase inorgánica (sílice) que queda incluida durante el proceso de la absorción y reacción sol-gel *in situ* aumenta con la porosidad, tal como lo evidenció la determinación por cambio de peso (Figuras 15 y 16).



**Figura 14** Curvas típica de degradación térmica (TGA) para un hidrogel de PHEA.



**Figura 15** Curva de degradación térmica (TGA) para los materiales híbridos PHEA-SILICE.



**Figura 16** Curvas de degradación para el hidrogel PHEA50 y su correspondiente híbrido PHEA50SI.

En la Figura 15 se evidencia que la presencia de sílice incrementa la resistencia a la degradación del material, pues se observa que los termogramas se desplazan hacia la derecha a medida que aumenta el contenido de sílice. Por su parte, en la Figura 16, en donde se comparan los termogramas de un par de muestras (el hidrogel PHEA50 y su



correspondiente material híbrido PHEA50SI), se hace más notoria la influencia debida a la presencia de sílice en la descomposición térmica del material compuesto.

**Tabla 3.** Valores de Tg y Delta de la capacidad calorífica a la Tg de los hidrogeles de PHEA y sus materiales híbridos obtenidos.

<i>Material</i>	<i>Tg( °C)</i>	<i><math>\Delta Cp(T_g)/w_{muestra} (Jg^{-1} \circ K^{-1})</math></i>
<i>PHEA0</i>	<b>2.8</b>	<b>0.43</b>
<i>PHEA0SI</i>	<b>6.5</b>	<b>0.39</b>
<i>PHEA 20</i>	<b>-0.2</b>	<b>0.42</b>
<i>PHEA20SI</i>	<b>16.6</b>	<b>0.30</b>
<i>PHEA30</i>	<b>3.6</b>	<b>0.44</b>
<i>PHEA 30SI</i>	No detectado	-----
<i>PHEA 40</i>	<b>0.7</b>	<b>0.41</b>
<i>PHEA 40SI</i>	No detectado	-----
<i>PHEA 50</i>	<b>1.3</b>	<b>0.41</b>
<i>PHEA 50SI</i>	No detectado	-----

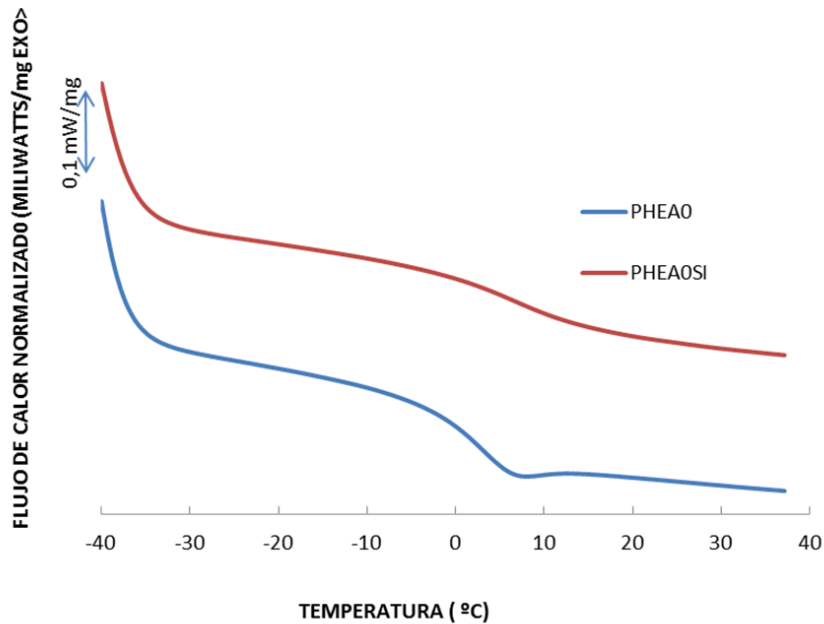
Otra técnica usada para caracterizar en forma comparativa los hidrogeles y sus híbridos fue el DSC. En general vale la pena resaltar que las transiciones vítreas fueron solo evidentes en los híbridos con contenidos menores del 30% m/m (PHEA0 y PHEA20SI) (Tabla 3). En la Figura 17 se presentan los termogramas de calentamiento comparativos de la pareja de materiales secos (hidrogel PHEA0 y el híbrido PHEA0SI). Como lo muestran los termogramas, en el material compuesto PHEA0SI la transición vítrea cubre un rango más amplio de temperatura con relación al PHEA0 y se desvía hacia temperaturas más altas.

El termograma DSC de la muestra seca en la región de la transición vítrea del PHEA0SI refleja el empaquetamiento de las nanopartículas de sílice y las cadenas poliméricas. Al comparar los materiales compuestos PHEA0SI Y PHEA20SI se observó que la transición vítrea se desplaza hacia temperaturas más altas y se ensancha. La transición vítrea está enmarcada en los arreglos de las cadenas de polímero con algunos nanómetros o decenas de nanómetros (Donth *et al.* 1996, Gómez Ribelles *et al.*1998). El hecho de que el intervalo de temperatura en la cual la transición vítrea ocurre se ensanche, significa que estos arreglos cooperativos llegan a ser más heterogéneos debido a la presencia de partículas de sílice.

El *onset* de la transición vítrea es desviado hacia temperaturas mayores, lo que podría interpretarse como que no hay rearreglo en las regiones poliméricas y no se comportan como un polímero puro ya que todas las cadenas de polímero poseen partículas de sílice

en distancias del orden de nanómetros. La desaparición de la  $T_g$  implica que el movimiento de las cadenas del polímero está fuertemente restringido por las partículas de sílice. La restricción también puede ser debida del entrecruzamiento por uniones entre las cadenas del polímero y las partículas de sílice. Estos resultados confirman la distribución homogénea de los materiales compuestos, dejando concluir que la formulación usada para el precursor de sílice fue homogéneamente absorbida por los hidrogeles de PHEA.

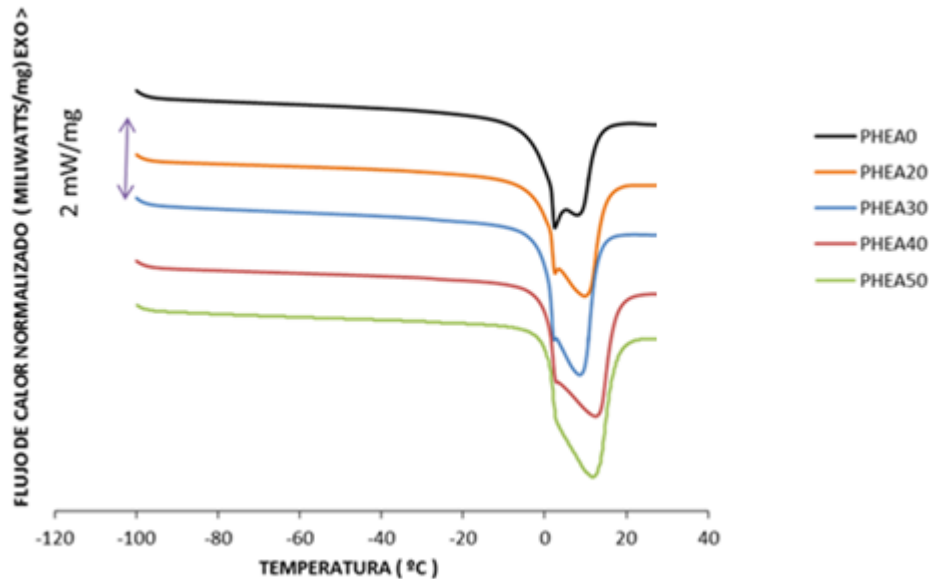
Por otra parte, el delta  $C_p$  a la  $T_g$  normalizada por peso de material  $[\Delta C_p(T_g)/w_{\text{muestra}}]$  fue calculado, encontrándose valores entre  $0.41\text{-}0.44 \text{ Jg}^{-1}\text{K}^{-1}$  para los hidrogeles, y más bajos ( $0.30\text{-}0.39 \text{ Jg}^{-1}\text{K}^{-1}$ ) para los materiales compuestos (Tabla 3). Sin embargo al calcular el valor normalizando para el peso de polímero este parámetro tenderá a aumentar para la pareja de materiales compuestos PHEA0SI y PHEA20SI.



**Figura 17** Termogramas de calentamiento en DSC para PHEA0 y PHEA0SI secos.

Como se muestra en los termogramas de calentamiento de hidrogeles puros hidratados (Figura 18), aunque la cantidad de agua de la que disponen para cristalizar es dependiente de la porosidad del hidrogel, la porción cristizable no está directamente relacionada con la capacidad para absorber agua (Tabla 4).

La disponibilidad de agua para la cristalización en las muestras húmedas, se determinó con los valores de flujo de calor normalizado hallados para cada muestra, el calor de fusión teórico del agua, y el contenido de agua (de acuerdo con el valor del total absorbido en el equilibrio). Con el calor de fusión del agua correspondiente para cada una de las muestras de los hidrogeles y de los híbridos, se pudo calcular la fracción de agua cristizable.



**Figura 18 Termogramas de DSC comparativo de muestras de hidrogel puro de PHEA hidratadas.**

Los termogramas DSC de calentamientos registrados para las muestras hidratadas de PHEA (Figura 18), muestran que el punto de fusión del agua es bastante aparente en todas las muestras de PHEA, y el *onset* del pico se presenta a 0°C. El área de la endoterma crece con la porosidad de la muestra, cómo era de esperarse debido al incremento de la cantidad de agua que llena los poros

En la Figura 19, se evidencia que cuando la sílice está presente, la cantidad de agua presente (absorbida), disminuye en forma marcada con el aumento de la cantidad de sílice en la muestra y que la proporción de agua disponible para la cristalización se reduce con relación al hidrogel (Tabla 4).

En los materiales hidratados, esta agua es capaz de cristalizar como se ve en los termogramas de calentamiento, en los picos de fusión de las muestras húmedas de las Figuras 18 y 19. Cuando se compara el pico de fusión del material compuesto con el de PHEA puro hidratado las diferencias son bastantes notorias. En las muestras de PHEA, el *onset* de la fusión está situado en 0°C, como corresponde al agua separada de las cadenas poliméricas. En contraste, en los termogramas de material híbrido, se inician desviándose de la línea base en la dirección endotérmica a alrededor de -40°C y produciendo un amplio pico endotérmico en el cual otra endoterma muy fina se superpone a 0°C. Los geles hidratados en agua a temperatura ambiente presentan separación de fase líquido-líquido: una de las fases consiste en agua pura líquida y la otra de una mezcla homogénea de agua y cadenas de polímero. Durante la cristalización del agua por enfriamiento, la parte de agua absorbida a temperatura ambiente se distribuye en dominios líquidos separados

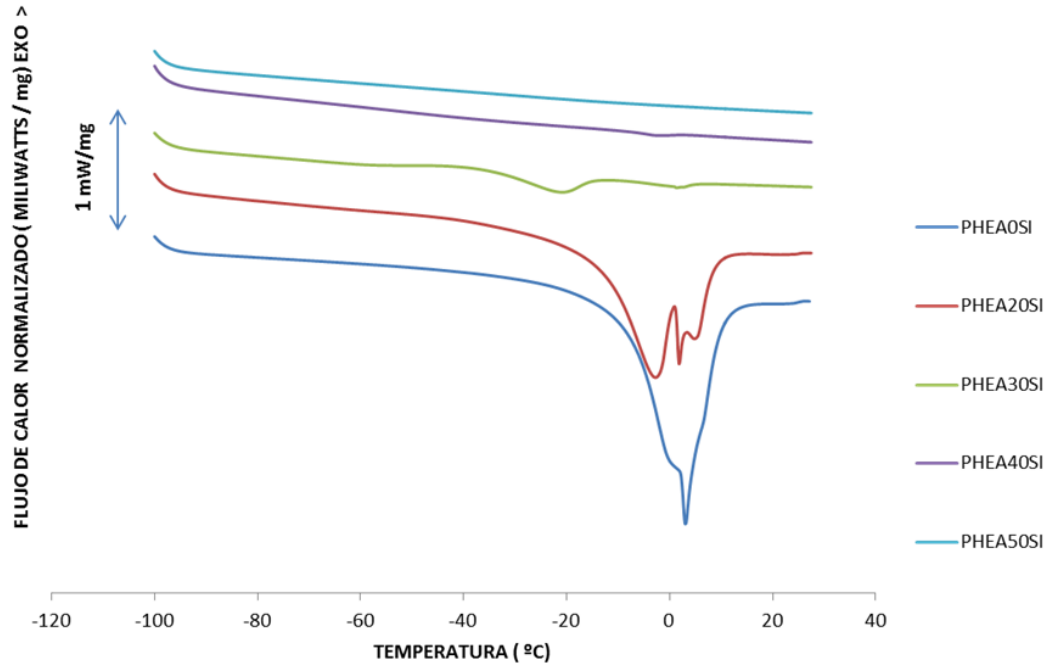
formando estructuras solidas suficientemente grandes para fundir como agua pura. De otra parte, en la mezcla polímero-agua, el equilibrio termodinámico que determina el agua de cristalización toma lugar a más bajas temperaturas. La fusión de estructuras de hielo inicia a más baja temperatura en los híbridos como lo muestra la Figura 19. La diferencia en el comportamiento de la fusión del PHEA puro y en el material compuesto, muestra una capacidad diferente del agua de migrar de la fase polimérica e incorporarse a cristales de hielo de mayor tamaño.

**Tabla 4.** Contenido de agua disponible para cristalizar en hidrogeles de PHEA e híbridos PHEA-SILICE.

<i>Material</i>	<i>Contenido de agua calculado</i>	<i>Porcentaje calculado de agua cristalizable</i>
<i>PHEA0</i>	65.6 %	87.7%
<i>PHEA20</i>	73.4%	87.4%
<i>PHEA30</i>	79.4%	83.2%
<i>PHEA40</i>	83.2%	91.0%
<i>PHEA50</i>	88.5%	88.8%
<i>PHEA0SI</i>	48.2%	79.3%
<i>PHEA20SI</i>	38.0%	66.4%
<i>PHEA30SI</i>	21.3%	<i>No fue posible calcularla</i>
<i>PHEA40SI</i>	11.9%	<i>No fue posible calcularla</i>
<i>PHEA50SI</i>	7.7%	<i>No fue posible calcularla</i>

La fracción promedio de agua cristalizable calculada con el calor de fusión y el contenido de agua de las muestras de PHEA fue de  $87.6 \pm 2.5$  ( resultado de los promedios de la Tabla 4), siendo independiente de la porosidad. En los materiales híbridos, el comportamiento con relación al agua de cristalización y fusión es de alguna manera semejante al de la transición vítrea del polímero en fase seca: en las muestras en las cuales el agua no puede cristalizar, la transición vítrea de la fase polimérica no se puede observar. La muestra PHEA0SI presenta una fracción de agua cristalizable un poco más baja a la de las muestras de PHEA puro y en PHEA20SI una fracción significativa del agua contenida es aún cristalizable (66%) pero es menor a la del PHEA puro. En PHEA30SI, solo un pequeño pico de fusión es detectado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y no se observa ni fusión ni cristalización en contenidos de sílice más altos.

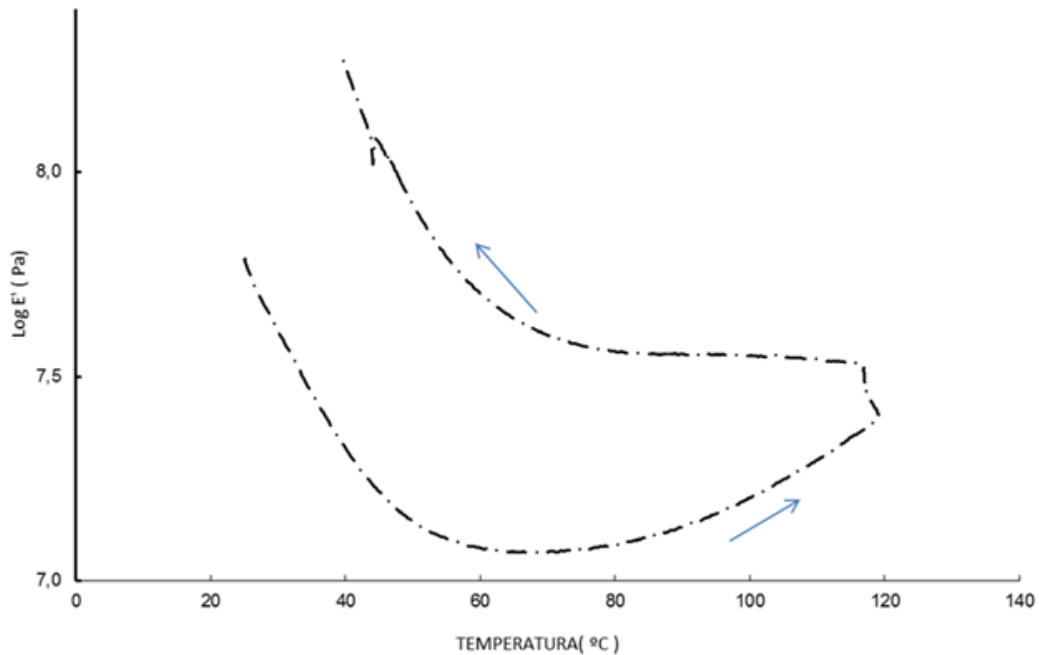
Es interesante en el termograma de calentamiento del PHEA20SI que muestra una primera endoterma por debajo de  $0^{\circ}\text{C}$ , el cual es seguido de un pico muy marcado a  $0^{\circ}\text{C}$ . El termograma de PHEA0SI es similar pero el pico a baja temperatura aparece como un hombro del de alta temperatura (Figura 19).



**Figura 19** Curva de calentamiento en DSC: Flujo de calor para la cristalización de muestras de híbridos PHEA-SILICE hidratadas.

Adicionalmente, las propiedades térmicas medidas por DMTA son muy significativas para entender el comportamiento viscoelástico de los materiales compuestos polímero/sílice. El módulo de almacenamiento ( $E'$ ), el módulo de pérdida ( $E''$ ), y la tangente delta ( $\tan \delta = E''/E'$ ), son tres parámetros importantes de las propiedades mecánico-dinámicas y se pueden usar para verificar la ocurrencia de transiciones en la movilidad molecular, tales como la  $T_g$  (Zou *et al.* 2008).

En general, las condiciones de la reacción sol-gel usadas para la hidrólisis *in situ* y condensación de TEOS en los geles de PHEA, tal como se infirió en apartados anteriores, no llegaron a la conversión total de los grupos ortosilicato en sílice, y por tanto la fase de sílice contiene grupos sin reaccionar. Esta afirmación se puede verificar por el hecho de que el módulo elástico de la muestra medido en un barrido de calentamiento DMTA entre 65 y 120 °C aumenta continuamente indicando el progreso de la condensación de la fase de sílice a temperaturas más elevadas que las usadas para la producción de los híbridos (40 °C) (Figura 20). Este aumento es irreversible ya que al efectuar el barrido de enfriamiento, el módulo de almacenamiento se mantiene, tal como lo demuestra la Figura 20.



**Figura 20 Efecto de la temperatura en el módulo de almacenamiento ( $E'$ ) de la muestra PHEA0SI sometida a un barrido de calentamiento a 1Hz, entre 25 y  $120^{\circ}\text{C}$  seguido de un enfriamiento de 120 a  $25^{\circ}\text{C}$ . Tomada y traducida del original en Plazas *et al.* 2013.**

### 3.3.6. Ensayos Mecánicos

Uno de los requerimientos más importantes de un material compuesto es el balance entre la resistencia a una fuerza, la dureza y la deformabilidad. Por esta razón, es necesario caracterizar las propiedades mecánicas desde diversos aspectos. Entre las muchas medidas para evaluar las propiedades mecánicas se encuentran la fuerza tensora, la resistencia al impacto, la dureza y la facilidad de fractura. La dureza, se refiere a las propiedades de resistencia del material a cambios en su forma cuando se aplica una fuerza. Esta es una propiedad fundamental para muchas aplicaciones de los materiales. Existen tres tipos principales de dureza: resistencia a la fractura o deformación plástica, deformación debida a un elemento cortante y dureza a la indentación (resistencia a la deformación plástica o al impacto de un objeto). Es común que después de un porcentaje de contenido de fase inorgánica, la matriz polimérica presente disminución en sus propiedades mecánicas, situación que puede ser atribuida a un incremento en la tendencia de las partículas (en este caso de sílice) a aglomerarse a altas concentraciones (Zou *et al.* 2008).

A través de un ensayo de indentación, usando un indentador plano de forma cilíndrica y con una superficie de contacto mucho más pequeña que la muestra, se caracterizó el comportamiento mecánico de los geles y de los híbridos, a través de la relación entre la fuerza aplicada y la penetración del indentador.

En los esquemas de ensayos mecánicos, en donde se aplica un perfil de deformación controlada, el ensayo se denomina deformación por indentación, en cuyo caso el equipo aplica un perfil de deformación. Este ensayo puede ser llamado "ensayo de indentación por esfuerzo" (usualmente a una velocidad constante de penetración), produciendo una curva de la cual se puede calcular el valor del *Módulo Elástico* del material. Cuando se aplica una fuerza dependiente del tiempo, el ensayo se denomina "ensayo de indentación de *creep*". En nuestro caso se trató de una fuerza de compresión aplicada por el indentador, que incrementa linealmente. Con la curva de Fuerza-Penetración experimental es posible calcular la *Compliance* del material ( Mak *et al.* 1987, Lu *et al.* 2003).

El ensayo se fundamenta en la relación Fuerza (P)-Penetración ( $w$ ), plantada por Hayes *et al.* (Hayes *et al.* 1972), quienes encontraron la solución que se plantea en la Ecuación 15, para un ensayo de indentación con una muestra de material con un espesor  $h$ , usando un indentador plano cilíndrico de radio  $a$ .

$$P = \frac{4ak}{(1-\nu)} G_w \quad \text{Ecuación 15}$$

El término  $\kappa$  de la ecuación 15, es un parámetro adimensional, el cual depende de la relación  $a/h$  y el coeficiente de Poisson  $\nu$ , del material; y  $G_w$  es el modulo elástico (Hayes *et al.* 1972).

La respuesta de un sólido viscoelástico lineal a la indentación por *creep* para cualquier historial de carga ha sido determinado según la técnica propuesta por Lee y Radok (Lee y Radok 1960); que a su vez fue usado por Lu *et al.*, para encontrar la solución a la relación carga-penetración en el caso de un indentador cónico o esférico ( Lu *et al.* 2003).

Siguiendo estas propuestas y usando la ecuación de Hayes (Ecuación 15) para un indentador plano y cilíndrico, se puede encontrar que

$$J(t) = \frac{4ak}{(1-\nu)} \left[ \frac{dP}{dt} \right] \frac{dw}{dt} \quad \text{Ecuación 16}$$

Donde,  $\frac{dP}{dt}$ , es la velocidad de carga usada en el ensayo, y  $\frac{dw}{dt}$  es la velocidad de penetración al valor de penetración evaluada, que para el caso de las muestras de hidrogeles de PHEA y sus híbridos, fue a 45  $\mu\text{m}$ .

Los resultados de los valores de  $J(t)$  encontrados que corresponde con una penetración indicada (45  $\mu\text{m}$ ) son presentados en la Tabla 2 y comparativamente en la Figura 21. Para el caso de la muestra PHEA50SI, no fue posible realizar la medida ya que se trata de una muestra muy dura para medirle la *Compliance* por este método.

Es evidente que la *Compliance* de las muestras secas polimerizadas con variadas cantidades de etanol aumenta linealmente con la cantidad de diluyente adicionando durante la polimerización y por ende el tamaño del poro del hidrogel de partida. Esto se podría explicar por la presencia de discontinuidades en la superficie del xerogel, que no importando si el poro colapsa, produce movimientos de estas superficies aumentando la deformación del material bajo sollicitaciones mecánicas. Por tanto la propiedad mecánica evaluada depende marcadamente de la porosidad de hidrogel.

Los bajos valores de la *Compliance* de las muestras híbridas secas soportan que la sílice percola e impide la deformación del polímero. Los experimentos de indentación soportan el hecho de que la difusividad de la solución del precursor es más lenta al ser absorbida por el polímero que cuando la síntesis se da en simultaneidad con la síntesis de la fase polimérica (Rodríguez *et al.* 2007), dada la moderada diferencia entre los valores de *Compliance* de PHEA0, el cual disminuye de  $4.6 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{N}$  a  $1.4 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{N}$  en PHEA0SI (Tabla 2). Esto podría explicarse por la falta de percolación de las partículas de sílice en la muestra de PHEA0SI. Sin embargo este planteamiento estaría en contraposición con lo que muestran los termogramas de las muestras en el DSC en la región de la transición térmica, los cuales reflejan un empaquetamiento de las nanopartículas de sílice y las cadenas poliméricas puesto que la  $T_g$  es desplazada a más altas temperaturas y se presenta como una señal ensanchada.

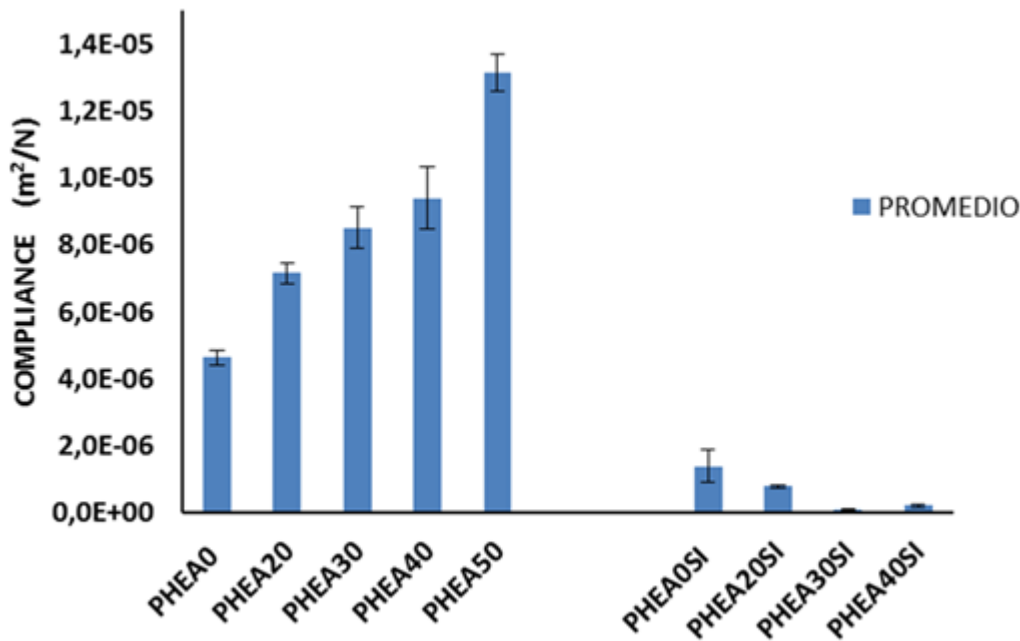


Figura 21 Valores de la *Compliance* ( $\text{m}^2/\text{N}$ ) para los hidrogeles puros de PHEA y los híbridos PHEA-SILICE.



### 3.3.7. Ensayo de Bioactividad

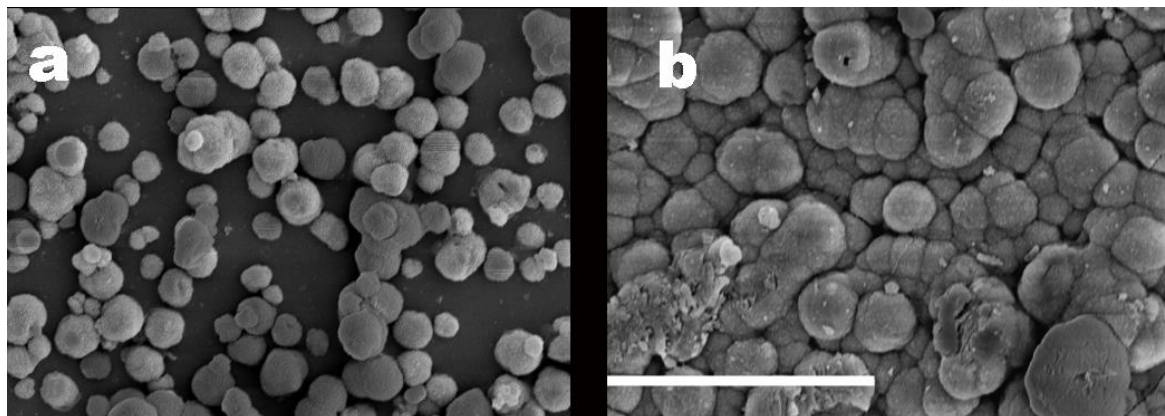
Considerando que un material bioactivo es aquel que induce una actividad biológica específica (Bohner y Lemaître *al.* 2009), que para el caso de los materiales para regeneración o reemplazo óseo puede ser la capacidad de unirse a hueso vivo a través de la formación en su superficie de apatita similar a la ósea; resulta fundamental cumplir con esta propiedad de bioactividad (Kokubo 1991, Kokubo y Takadama 2006). No obstante puntos de vista opuestos que han declarado que de acuerdo con la teoría de la cristalización, la bioactividad y la formación de apatita en solución SBF son dos fenómenos diferentes; la formación de apatita a través de la inmersión de las muestras en SBF (ensayo *in vitro*) (Bohner y Lemaître 2009) ha sido considerado durante años por la comunidad involucrada en la investigación de biomateriales como una prueba útil para predecir la bioactividad de un material e inferir el desempeño *in vivo*.

Es por esta razón que la bioactividad de estos materiales híbridos de sílice se evaluó con el método de Kokubo (Vallés 2008).

Como base para la evaluación del resultado del ensayo, se tomaron las microfotografías por análisis en SEM de las muestras después de una y dos semanas de inmersión en SBF, valorando las diferencias presentadas entre hidrogeles PHEA puros y los materiales híbridos PHEA-SILICE. La Figura 22 muestra las imágenes comparativas de SEM para PHEA30 y PHEA30SI. En general, se pudo ver que al final de la primera semana, no se observó deposición evidente de apatita, sin embargo, después de dos semanas, los cristales de apatita con la morfología de la coliflor se observaron tanto en PHEA puro como en los materiales híbridos, con un incremento claro de la deposición de sales en la superficie de los híbridos con respecto a PHEA de muestras puras.

Adicionalmente a las imágenes SEM, la aplicación de análisis de EDS permitieron establecer la naturaleza de la capa que se observa en la superficie de las muestras.

Por otra parte, la determinación del peso antes y después del período de inmersión en SBF, permitió también verificar si se presentan cambios apreciables. En la Tabla 5, los resultados del análisis elemental por EDS muestran que la relación de calcio / fósforo fue mayor para las muestras PHEA-SILICE (entre 1,6 y 2,2), en comparación con PHEA pura (~ 1,4).



**Figura 22** Microfotografías de SEM de PHEA30 (a) y de PHEA30-Si (b) después de dos semanas de inmersión en SBF. La dimensión de la barra corresponde a 20  $\mu\text{m}$ . Tomada y traducida del original en Plazas *et al.* 2013.

Los resultados de la evaluación de bioactividad *in vitro* basados en la formulación y el método desarrollado por Kokubo y Takadama (Kokubo and Takadama 2006), mostraron diferencias significativas en la apariencia microscópica de las superficies de hidrogeles PHEA y los materiales híbridos después de dos semanas de inmersión en SBF. Los análisis de EDS e imágenes de SEM indican la formación de una capa de fosfato de calcio en la superficie; al mismo tiempo, que se observa una pérdida de peso en los híbridos (no en los hidrogeles PHEA puro), lo que se explica debido a la disolución de sílice en SBF. Vale la pena señalar que la pérdida de peso en las muestras sumergidas en SBF está relacionada con el incremento de la porosidad de la PHEA inicial. Esto significa que no sólo las nanopartículas de sílice formadas en la red de PHEA y confinados por las cadenas de polímero son solubles, sino también los microdominios de sílice formadas en los microporos de PHEA. Este hecho abre la posibilidad de diseñar materiales híbridos bioactivos a partir de hidrogeles ya preformados (Kokubo 1991, Kokubo, Tadashi *et al.* 2006, Bohner y Lemaitre. 2009).

En general las propiedades de los híbridos dependen de la interacción en la interfase orgánica-inorgánica, y aunque no se dispuso de una metodología o técnica específica que permitiera claramente establecerla, a través de los resultados de las técnicas de caracterización aplicadas y su evaluación conjunta se llegó a la conclusión de que las fases interaccionan a nivel nanométrico favoreciendo en alguna medida el reforzamiento de propiedades mecánicas (Zou *et al.* 2008, Valliant y Jones 2011).

**Tabla 5.** Resultados del ensayo de Bioactividad después de dos semanas de inmersión en SBF. Tomada y traducida del original en Plazas *et al.* 2013.

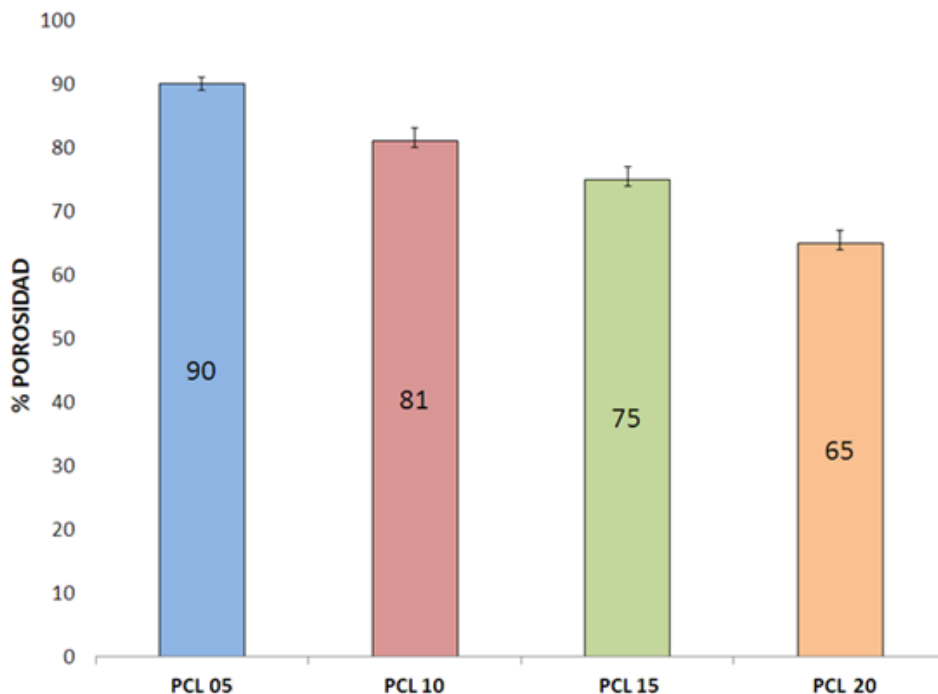
MATERIAL	Cambio de peso (%)	Relación atómica promedio final O/Si	Relación atómica promedio final Ca/P
PHEA0SI	-5.0	31.2	2.2
PHEA20SI	-4.3	30.5	1.6
PHEA30SI	-4.5	79.8	2.2
PHEA40SI	-10.5	No evaluado	No evaluado
PHEA50SI	-15.5	No evaluado	No evaluado
PHEA CONTROL	3.2		1.4

### 3.4. Caracterización de membranas y *scaffolds* de PCL y de sus *composites* PCL–sílice obtenidos por catálisis ácida y/o básica

#### 3.4.1. Porosidad de las membranas y *scaffolds* de PCL

La técnica *freeze extraction* es reconocida por producir materiales microporosos con una red de poros bien interconectada (Lebourg *et al.* 2008a).

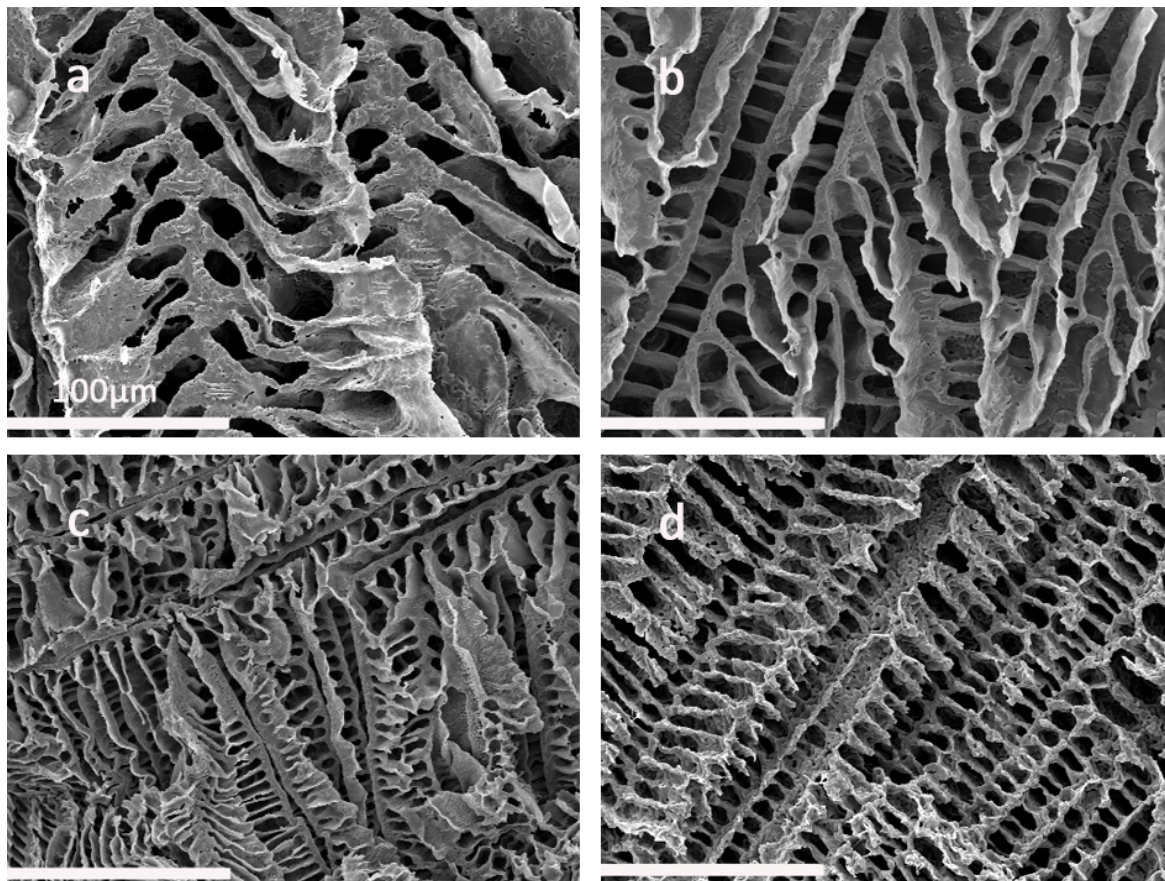
Los resultados que se observan en la Figura 23, muestran que la porosidad promedio de las membranas de PCL preparadas por el método *freeze extraction* usando diversos porcentajes de PCL en dioxano (5,10,15 y 20% m/m), tiene una marcada dependencia con la fracción del polímero utilizado en la elaboración de la solución inicial. Para esta determinación se usó como parámetro de medida, la cantidad de etanol que es capaz de introducirse en los poros del material aplicando vacío.



**Figura 23 Porosidad de las membranas de PCL preparadas con soluciones de diversos porcentajes de polímero en dioxano.**

Los poros se generan mediante la congelación de ambos componentes (polímero y disolvente) cuando se enfría la solución del polímero, a temperaturas inferiores al punto de congelación. Dado que la PCL es un polímero semicristalino, tres fases coexisten en el material a bajas temperaturas después del enfriamiento: el polímero amorfo, los cristales de PCL y el disolvente sólido. En nuestro caso, el disolvente (dioxano) podía ser extraído del material con etanol frío, a una temperatura menor que el punto de fusión de dioxano, lo cual conlleva a la formación de la estructura porosa. Por tanto, la porosidad de la membrana de PCL pudo ser modulada por el cambio de la concentración de la solución de PCL inicial. Como se muestra en la Figura 23, el aumento del contenido de PCL en la solución, desde un 5 % hasta un 20 %, produce porosidades que van desde 90 % a 65 %. Las imágenes SEM (Figura 24) muestran que el tamaño de poro de las membranas es del orden de algunas micras y confirman en forma comparativa y cualitativa los resultados cuantitativos de porosidad obtenidos.

La conectividad de los poros se demuestra al verificar el llenado de estos a través de la inmersión de la muestra en un disolvente después de extraer el aire de los poros en alto vacío. Esta interconexión es esencial para la preparación de los materiales compuestos, puesto que la solución del precursor debe penetrar en toda la estructura porosa de la membrana debido a que no puede difundir a través de las paredes de PCL.



**Figura 24** Microfotografías de SEM de las secciones transversales de membranas de PCL pura: (a) PCL05, (b) PCL10, (c) PCL15 y (d) PCL20. Tomada y traducida del original en Plazas *et al.* 2014.

### 3.4.2. Microestructura y composición de los *composites* en fase inorgánica

Las cantidades de fase inorgánica presente en los *composites* PCL-SÍLICE fueron evaluadas teniendo en cuenta los resultados de los ensayos de diferencia de peso, TGA y pirólisis. La morfología de la estructura obtenida se evaluó por medio de las imágenes de SEM.

Como se verificará más adelante en los resultados de absorción de agua y ángulo de contacto, la PCL es altamente hidrófoba, situación que no favorece la introducción de la solución precursora de sílice para producir la fase inorgánica. Esta condición y la baja solubilidad de TEOS en agua determinan el uso de un cosolvente en la formulación de la solución del precursor de sílice para así favorecer su penetración en los poros de la membrana. Por lo tanto, para preparar la citada solución, el TEOS se mezcló con agua y etanol además del catalizador y para introducirla en la estructura del polímero se requirió el uso de un sistema de vacío. De acuerdo con los resultados encontrados, la reacción sol-

gel se lleva a cabo dentro de los poros y la morfología de la fase de sílice es completamente diferente dependiendo del catalizador utilizado.

**Tabla 6.** Concentración de las soluciones PCL utilizados para preparar las membranas de PCL y los materiales compuestos correspondientes. Codificación de muestras y contenido de sílice en catálisis ácida y básica. Adaptada y traducida del original en Plazas *et al.* 2014.

% de PCL en dioxano	Codificación de la membrana de PCL pura	Codificación del material compuesto obtenido por catálisis ácida	Contenido de sílice usando catálisis ácida	Codificación del material compuesto obtenido por catálisis básica	Contenido de sílice usando catálisis básica
5	PCL05	PCL05SIA	63±1	PCL05SIB	17
10	PCL10	PCL10SIA	48±8	PCL10SIB	9
15	PCL15	PCL15SIA	41±8	PCL15SIB	4
20	PCL20	PCL20SIA	33±1	PCL20SIB	6

La reacción sol-gel que se produjo dentro de los poros de las membranas dio como resultado materiales compuestos cuyas propiedades microscópicas y macroscópicas dependen en gran medida del catalizador utilizado y de la porosidad de la membrana de PCL de partida. La cantidad de la fase inorgánica en los *composites* también es dependiente de la porosidad de la membrana y como consecuencia de ello está muy influenciada por la de la fracción del polímero utilizado en la solución inicial de PCL en dioxano (5,10,15 y 20 % m/m) (Tabla 6).

Cuando la reacción sol-gel es catalizada por HCl, los contenidos de sílice alcanzaron valores entre ~ 33 y ~ 63 % w / w, siendo este último valor, el correspondiente a la muestra PCL05SIA, producto de la membrana más porosa. Cuando disminuye la porosidad inicial de la membrana, que a su vez disminuye con el aumento de la fracción de PCL en la solución dioxano original, el contenido de sílice también disminuye (Tabla 6).

Comparando los valores calculados por diferencia de peso antes y después del tratamiento de sol-gel; el uso de medio básico produce contenidos más bajos de sílice ( entre ~ 4 a ~ 17 %) con relación a la catálisis ácida, siendo también, menos reproducible (límites de confianza no calculados). Este resultado se atribuye a la pérdida de nano esferas de sílice de la muestra durante las diferentes etapas de preparación híbrido ya que están ligeramente adheridas a las paredes de los poros o más bien no lo están. Esto explica el bajo y variable contenido de sílice de las muestras producidas usando el catalizador básico ya que una fracción significativa de estas partículas se pierde por ejemplo en el proceso de lavado final(Tabla 6).

Las microestructuras de los *composites* obtenidos por catálisis ácida o básica, son completamente diferentes a pesar que macroscópicamente parecen ser muy similares. Como se muestra en la Figura 25, los materiales compuestos sintetizados por catálisis ácida (HCl en este caso), se presentan una película continua que cubre la superficie de las paredes de los poros del polímero, produciendo de este modo una capa delgada de sílice que cubre perfectamente las superficies de polímero (Figuras 25a y 25c). De hecho, las imágenes SEM de las secciones transversales de los *composites* se parecen a los de la membrana de PCL (Figura 24a). Curiosamente, la arquitectura de los poros en el híbrido permanece abierta a pesar que la porosidad disminuye con respecto a la membrana PCL debido al engrosamiento de las paredes de los poros con el revestimiento de sílice.

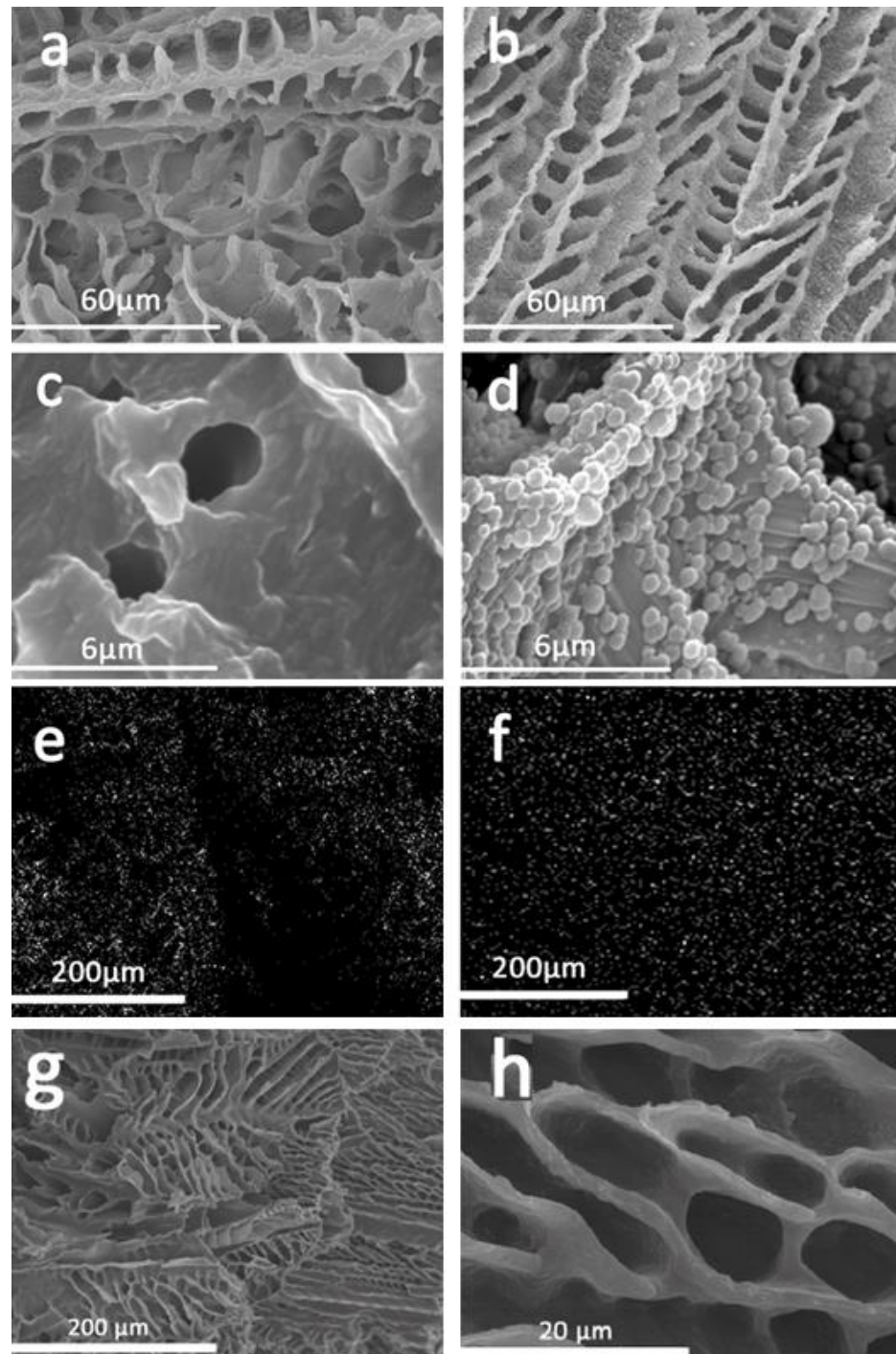
Las imágenes SEM de las secciones transversales de las membranas con sílice muestran que la fase de sílice cuando es sintetizada mediante la reacción sol-gel catalizada en medio básico produce agregados de partículas esféricas, dentro de los poros (Figuras 25b y 25d). La catálisis básica con  $\text{NH}_4\text{OH}$ , favorece la nucleación rápida de la fase de sílice a partir de TEOS, con una producción de un alto número de partículas esféricas dispersas dentro de los poros. Este fenómeno se ha usado en la producción de nanopartículas de sílice por reacción sol - gel y se conoce como el proceso Stöber (Stöber *et al.* 1968) (Figuras 25b y 25d).

Las caracterizaciones morfológicas por SEM de las muestras que incluyeron en su preparación el quitosano, GPTMS y TEOS (Figuras 25g y 25h) y de los *scaffolds* de PCL-SILICE; fueron similares a las de las membranas preparadas solo con TEOS en medio ácido. La diferencia encontrada con las primeras radica en el hecho de que en algunas muestras se alcanzaban a observar lo que serían fibras de quitosano (no observable en las Figuras presentadas en este documento) (Trujillo *et al.* 2014).

El análisis por SEM del residuo de pirólisis confirmó la presencia y la continuidad de la fase de sílice y la distribución homogénea de la sílice en los *composites* PCLSIA ya que las muestras sometidas a este proceso térmico mantienen la estructura del híbrido original, tal como se aprecia en las microfotografías de la Figura 26. La forma macroscópica también se observó muy similar, mientras que las membranas PCLSIB se reducen a polvo después de la pirólisis.

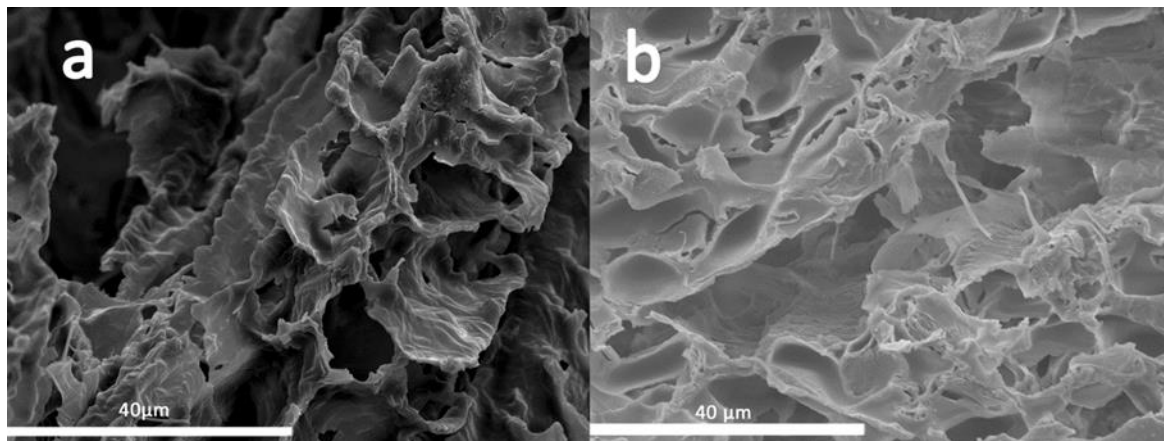
Estas consideraciones respecto a la estructura morfológica del residuo de ignición de las muestras que incluyeron en su preparación el quitosano, GPTMS y TEOS y de los *scaffolds* de PCL-SILICE son similares a los encontrados para las membranas de PCL-SÍLICE producidas en medio ácido (mantienen la estructura inicial del *composite*).





**Figura 25** Microfotografías SEM de la sección transversal de (a) PCL15SIA, (b) PCL15SIB. En (c) y (d) se presenta aumento de (a) y (b) respectivamente. Mapeo de silicio por análisis EDS de (e) la superficie PCL15SIA y de (f) la sección transversal PCL15SIA (g) Sección transversal de PCL10C1G65T21 (h) Aumento de (g). Adaptada y traducida de los originales en Plazas *et al.* 2014 y en Trujillo *et al.* 2014.





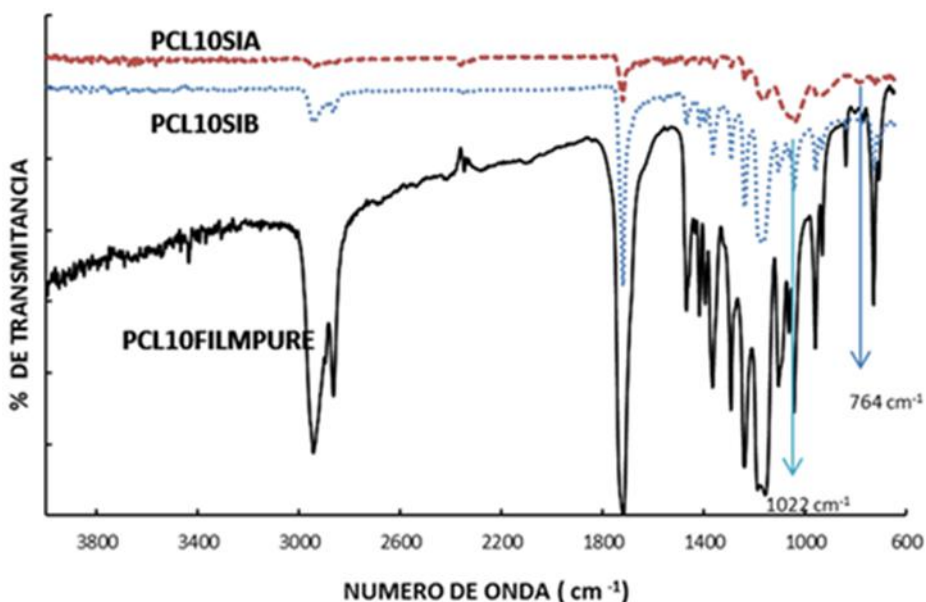
**Figura 26** Imágenes SEM de la sección transversal de PCL5SIA (a) Antes y (b) Después de la pirolisis. Tomada y traducida del original en Plazas *et al.* 2014.

La presencia de sílice en composites se evaluó por IR (Figura 27) y la homogeneidad de la distribución de sílice en la reacción catalizada por ácido se comprobó por análisis de EDS registrada tanto, en la superficie y en sección transversal de la muestra (Figuras 25e y 25 f).

En las Figuras 25e y 25f, es evidente la homogeneidad en silicio en los materiales compuestos PCL15SIA (sección transversal y de la superficie). Así mismo se evaluó la relación atómica oxígeno: silicio en diferentes puntos, tanto en la superficie como en la sección transversal. El valor promedio encontrado fue de 2,9 para la superficie y 3,1 para la sección transversal (con una desviación estándar de 1,1 y 1,0 respectivamente), pero evidentemente debe tenerse en cuenta la presencia de oxígeno de la PCL al hacer la evaluación. Cuando se evaluó una muestra estándar de sílice, se encontró una relación de 1,8 con una desviación estándar de 0,57.

El espectro de FTIR de la red de PCL (Figura 27), presenta señales características en 1710-1720  $\text{cm}^{-1}$  del grupo carbonilo (C=O de estiramiento), señales alrededor de 2800 a 2950  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes al estiramiento del CH alifático y en 1400  $\text{cm}^{-1}$  a los enlaces a  $\text{CH}_2$ .

Como ejemplos de espectros infrarrojos se presentan los de los materiales compuestos PCL10SIA y PCL10SIB, en los que se nota que se reducen las intensidades de pico del éster (estiramiento C=O) a 1710 -a 1720  $\text{cm}^{-1}$ . Al igual las señales entre 600 y 1600  $\text{cm}^{-1}$ , tienen una tendencia a disminuir a medida que el contenido de sílice es mayor. Las señales que se atribuye a enlaces Si-OH que se esperan a 970  $\text{cm}^{-1}$  se desplazan a 920  $\text{cm}^{-1}$  y se ven claramente en PCLSIA pero no tanto en PCLSIB. La señal esperada a 798  $\text{cm}^{-1}$  se desplaza a 764  $\text{cm}^{-1}$  y se detecta en PCLSIA pero no se identifica fácilmente en PCLSIB. Una señal esperada en 1080  $\text{cm}^{-1}$ , debido a Si- O-Si se observa a 1022  $\text{cm}^{-1}$  y se identifica de manera más notoria en PCLSIA que en PCLSIB.



**Figura 27 Espectros FTIR de la película de PCL10 y los correspondientes composites PCL10SIA y PCL10SIB. Los espectros se desplazan en el eje Y para mayor claridad.**

En el caso de las membranas en que se incluyó en la fase inorgánica el uso de quitosano y GPTMS, la confirmación de la presencia de la fase de sílice es más compleja pues en el espectro IR se presentan una gran cantidad de grupos funcionales que se pueden superponer enmascarando las señales de la fase de sílice. Por otra parte con el análisis por EDS, el oxígeno presente en el quitosano y la PCL produciría una gran variedad de relaciones oxígeno:silicio.

En general, se puede decir que las señales no son bien detectadas ya sea debido a la baja concentración de sílice o porque algunas señales del polímero presentan una mayor intensidad superpuesta en el intervalo de número de onda que se encuentra normalmente para el compuesto puro. Sin embargo, aunque esta técnica ayuda en la verificación de la presencia de grupos funcionales producto de la sílice; con respecto a posibles uniones entre las fases orgánicas y la sílice en los materiales compuestos, no se puede concluir enfáticamente nada como si sería posible hacerlo con el uso de RMN de silicio, equipo del cual no se disponía. No obstante, todo el contexto de la caracterización realizada a los materiales permite hacer inferencias a este respecto.

Con el fin de realizar en forma puntual una comparación de la presencia y la cantidad de fase inorgánica en los composites de las membranas PCL10SIA y PCL10SIB y del scaffold; se estimó el contenido de sílice utilizando TGA y el tratamiento térmico en medio oxidante (pirólisis).

**Tabla 7.** Algunas propiedades físicas de la membrana PCL10, el *scaffold* de PCL y sus materiales compuestos.

Material	% Contenido de sílice <sup>(1)</sup>	Residuo en TGA	Residuo en Pirolisis	Porosidad (%)	Compliance (m <sup>2</sup> /N)	Cambio de peso Ensayo de Bioactividad <sup>(2)</sup>	Absorción de agua promedio (A las 48 horas)	Ángulo de contacto
PCL10	0	2	0.2	Membrana 81±2	Membrana 1.5E-06 +/- 7.4E-07	+ 1.4	15.9%	123°
				Scaffold 81±1	Scaffold 8.4E-06 +/- 1.87E-06	-----		
PCL10SIA	48	32	38	68±3	Membrana 3.7E-07 +/- 3.7E-08	-4.9	45.4%	76°
PCL10SIB	9	6	12	82±2	Membrana 1.1E-06 +/- 1.1E-07	-10.2	-----	96°
PCL10C1G65 T21	72 **	54	----	No determinado	3.5-07	No realizado	60 %	98°
QUITOSANO	-----	30	----	-----	-----	-----	168 %	89°
PCL10SIA <sub>scaff</sub>	29	21	23	71 ±7	1.9E-06 +/- 6.7E-07	-----	-----	76°

<sup>(1)</sup> Calculado por diferencia de peso antes y después de la reacción sol-gel.

<sup>(2)</sup> + (POSITIVO): Aumento; - (NEGATIVO): Disminución; Determinado en la segunda semana de inmersión en SBF, para los *composites* catalizados en medio básico y tres semanas para los *composites* catalizados en medio ácido.

\*\* Sílice más quitosano.

Como se muestra en la Tabla 7, después de la degradación de la fase orgánica, la fracción en peso residual de los materiales compuestos obtenidos por catálisis ácida es menor que la cantidad de sílice calculado por pesada. Este hecho apoya la hipótesis de que la reacción sol-gel no es completa a 40 °C, y una fracción de los grupos orgánicos aún permanece en la fase de sílice y se pierden durante el tratamiento a altas temperaturas, bien sea en atmósfera de nitrógeno o en presencia de oxígeno. Sin embargo, los resultados encontrados en los *composites* catalizados en medio básico no permitieron llegar a la misma conclusión que en el medio ácido.

Como se observa en la Tabla 7, al comparar en forma transversal la porosidad para la membrana de PCL10 y sus materiales compuestos se puede evidenciar que la PCL10SIA presenta una porosidad menor (68 %) a la de la membrana de PCL10 cuya porosidad fue muy similar a la del material catalizado en medio básico PCL10SIB (82%).

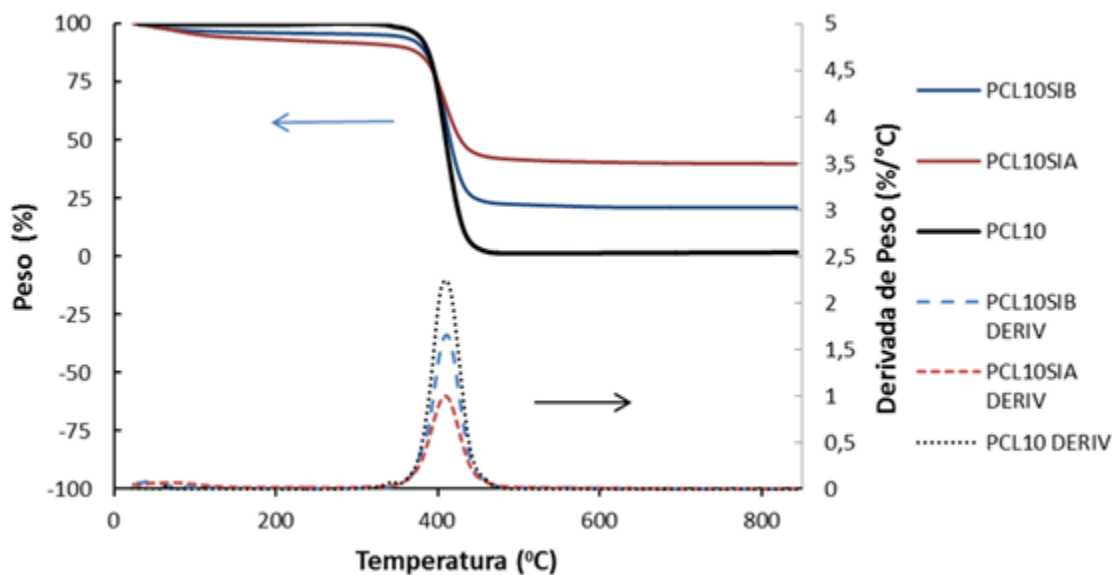
### 3.4.3. Propiedades hidrofílicas: Absorción de agua y ángulo de contacto

Para la membrana PCL10 (con porosidad  $\sim 81\%$ ), se esperaría un aumento de peso alrededor de  $\sim 350\%$  como producto de la absorción de agua. Sin embargo, tal como se presenta en la Tabla 7, sólo se observó un aumento de peso del  $\sim 16\%$  después de 48 h. Adicionalmente, el ángulo de contacto de la membrana porosa de PCL10 con el agua fue de alrededor de  $\sim 123^\circ$ , valor que disminuye a  $96^\circ$  en PCL10SIB (cuando la reacción para obtener el *composite*, es catalizada por base) y a  $76^\circ$  para PCL10SIA (cuando es catalizada con ácido). Ello indica que evidentemente hay una exaltación de las propiedades hidrofílicas, más marcada con el tratamiento en medio ácido que en medio básico; información con la cuál se podría inferir el efecto que puede darse en las propiedades de bioactividad de los *composites* con relación al PCL puro, la cual indudablemente se espera y es mayor en los productos de la catálisis ácida.

Como se observa en la Tabla 7, cuando se usa quitosano y GPTMS en la preparación de las membranas se obtiene un mayor % de absorción de agua, respuesta a una mayor capacidad de hidrofiliidad conferida por el quitosano y la sílice. De nuevo vale la pena mencionar que por la porosidad del material ( $80\%$  para PCL10), se esperaría tener un valor de absorción de agua del  $349\%$ , que no se puede obtener por la hidrofobicidad de la PCL, y que aun habiendo de por medio la presencia del quitosano, la absorción no llega a ser la esperada por cálculo teórico para rellenar los poros de la membrana. Esta situación también podría estar relacionada con el volumen que por sí mismo ocupa la capa de sílice en el poro. Adicionalmente, se esperaría que se presentaran enlaces entre el quitosano y la sílice que estaría formando la red inorgánica lo que llevaría a disminuir la capacidad de hinchamiento del quitosano y por tanto la capacidad de absorber agua.

### 3.4.4. Propiedades Térmicas: Calorimetría Diferencial de Barrido, (DSC) y Termogravimetría (TGA)

Las curvas de TGA para el polímero puro y para los materiales compuestos de PCL-SÍLICE catalizados por ácido y base se muestran en la Figura 28. Los termogramas de TGA de los materiales compuestos obtenidos por catálisis ácida muestran una pérdida de peso desde valores de temperatura ambiente hasta  $200^\circ\text{C}$ ; lo que se puede asociar con el progreso de la condensación de sílice, con pérdida de agua y etanol. Esta pérdida de peso a temperaturas bajas en el barrido TGA se correlaciona en forma directa con el contenido de sílice total en el híbrido, determinado por el residuo a  $800^\circ\text{C}$ . Se observa que la pérdida total de peso entre  $T \sim 25$  y  $380^\circ\text{C}$ , aumentó a medida que la cantidad de material inorgánico en los compuestos fue mayor. Como lo indican los termogramas, la temperatura de la tasa máxima de pérdida de peso fue de aproximadamente  $407 \pm 2^\circ\text{C}$  para todas las muestras, lo que en realidad corresponde a la degradación de la fase de PCL (Figura 28).



**Figura 28** Termogramas de TGA de la membrana de PCL 10 y los composites obtenidos por catálisis en medio ácido ( PCLSIA ) y en medio básico ( PCL SIB).

La caracterización térmica de los materiales compuestos que involucraron la intervención de quitosano y GPTMS, de igual manera evidenciaron la formación de sílice tanto microscópicamente ( por el análisis en SEM) como macroscópicamente, en virtud de la similitud del resultado del ensayo de pirólisis, así como por la presencia de los enlaces Si-O en FTIR, que por su parte no permitió confirmar la unión entre los grupos amina del quitosano y el grupo epoxi del GPTMS. Sin embargo el ensayo de TGA mostró una clara desviación del pico de degradación principal del quitosano en los materiales compuestos (Trujillo 2012, Trujillo *et al.* 2014).

Dos escenarios diferentes se pueden identificar cuando la muestra se somete a un aumento de temperatura: Por una parte, los grupos silanol del TEOS que no han reaccionado se pueden liberar a altas temperaturas, conllevando a una reducción de la masa de la muestra. Por otra parte, mediante el aumento de temperatura, puede ocurrir una reactivación de la reacción sol-gel y aumento de la cantidad de la fase inorgánica. Evidencia de esta baja conversión se encontró en el análisis de TGA y de pirólisis, donde las muestras fueron sometidas a temperaturas muy por encima de la descomposición de la fase orgánica. El peso residual de los materiales compuestos obtenidos por catálisis ácida medidos por TGA y pirólisis mostraron una tendencia a ser menor que el valor calculado por diferencia de peso (véase Tabla 7). Esto apoya la suposición de que la reacción sol-gel no se completó a 40 °C , y una fracción significativa de los grupos orgánicos se mantiene en la fase de sílice y se pierden durante el tratamiento a altas temperaturas, ya sea en atmósfera de nitrógeno ( TGA ) o en una atmósfera oxidante (pirólisis). La Tabla7 también refleja que en catálisis básica, el efecto de la conversión de TEOS no es concluyente, probablemente debido a que la morfología de la fase de sílice como microesferas sueltas puede originar diferencias considerables entre la cantidad de sílice producido por la reacción sol-gel, y la de sílice

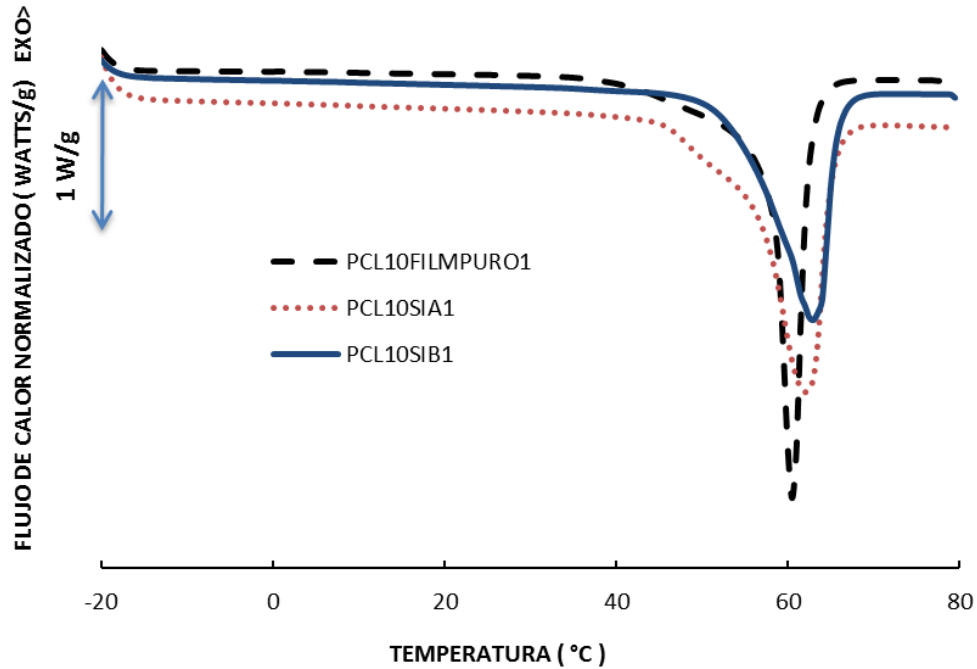
que permanece como residuo inorgánico en los tratamientos realizados durante el registro del termograma TGA y de pirólisis.

Los barridos de calentamiento en DSC que se presentan en la Figura 29, muestran un ensanchamiento del pico de fusión de PCL en los materiales compuestos con respecto a las membranas PCL puros, con un aumento de la temperatura de fusión del pico de los *composites* de PCL-SILICE en comparación con el PCL puro. Este efecto puede ser originado por una mayor cristalización secundaria del PCL durante el tratamiento a  $T \sim 40$  ° C en la etapa de condensación de la fase de sílice, llegando a producir cristalitas más gruesas y evidenciando un desplazamiento del valor del pico de fusión máximo hacia temperaturas más altas.

De igual manera, el calor de fusión de los materiales compuestos (54 J/g para PCL10SIA y 91 J/g para PCL10SIB) son menores que el valor obtenido para PCL puro (99 J/g).

Estos resultados afirman la condición de continuidad de la fase de sílice cuando está en la forma de un revestimiento de las paredes de los poros; pero se requerirían experimentos más específicos para evaluar si el ensanchamiento de la interface del pico de fusión de los materiales compuestos en los termogramas por DSC con respecto a PCL puede estar relacionado con la presencia de etanol en la formulación de precursor de sílice, y que una cierta absorción del disolvente mejore la cristalización secundaria de PCL durante el ciclo de nuevo calentamiento a 40 °C, posterior a la etapa de condensación de la fase de sílice. Este fenómeno es similar en los materiales compuestos producto de la reacción sol-gel catalizada en ácido y base.

El hecho de que el punto de fusión de la PCL sea alrededor de 60 ° C, como se muestra en la Figura 29, limita el uso de altas temperaturas para la reacción sol-gel. Esta condición debe tenerse en cuenta pues de acuerdo a los resultados obtenidos en diversos análisis las condiciones de reacción sol-gel utilizadas en este trabajo no permiten la conversión completa del precursor de sílice.



**Figura 29** Termograma DSC de calentamiento para la membrana de PCL10 y para los materiales compuestos producidos por reacciones sol-gel catalizadas por ácido y base. Adaptada y traducida del original en Plazas *et al.* 2014.

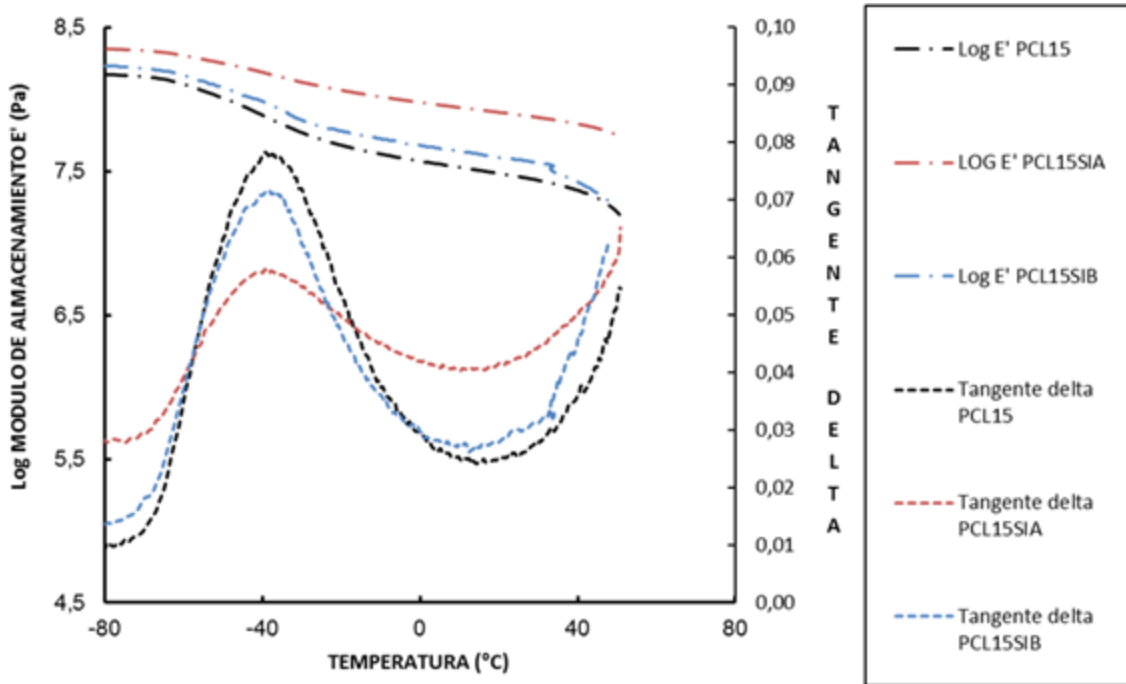
### 3.4.5. Ensayos Mecánicos

Las propiedades mecánicas se evaluaron a pequeñas deformaciones utilizando DMTA, que corresponde a un comportamiento de baja deformación lineal. La Figura 30 muestra la curva presentada para una membrana de PCL poroso puro y para sus correspondientes compuestos catalizados por ácido y base.

Además de DMTA, se realizaron dos tipos de ensayos para evaluar el desempeño mecánico (indentación y de tensión) que corresponden a propiedades que se relacionan con grandes deformaciones finales. Con el ensayo de tensión se pretendió determinar la curva esfuerzo-deformación y con el de indentación determinar la *Compliance* y comparar las curvas de carga- penetración.

Las partículas de sílice dispersas homogéneamente en la matriz de polímero juegan un papel clave, principalmente en propiedades mecánicas. No obstante la falta de adhesión entre las dos fases podría resultar en un fallo temprano en la interfase y por lo tanto en una disminución en las propiedades mecánicas, especialmente la resistencia a la tracción.

Desde un punto de vista mecánico, es probable que pueda tener lugar una transferencia de carga desde la matriz al refuerzo; si existe una débil unión interfacial entonces puede haber una deformación y se produce una ruptura que estimula el material a fallar.



**Figura 30 Efecto de la temperatura en el módulo de almacenamiento ( $E'$ ) y en la Tangente delta de la membrana de PCL15 y de los composites catalizadas por ácido y por base. Tomada y traducida del original en Plazas *et al.* 2014.**

Los resultados de los experimentos de indentación se representan en la Figura 31 en la forma de una curva carga - penetración; las curvas de esfuerzo-deformación medidos en el modo de tensión se muestran en la Figura 32.

La Figura 31a muestra el aumento de la rigidez de la membrana en el compuesto PCL-SÍLICE catalizada con ácido respecto a PCL puro; por el contrario no se detectó ningún efecto de refuerzo de la fase de sílice en los materiales compuestos catalizados con base. La Figura 31b presenta la dependencia de la rigidez con la porosidad de las membrana de PCL-SÍLICE catalizada por ácido.

En estos experimentos una rampa de fuerza lineal se aplicó al penetrador, lo que permitió determinar la *Compliance* en indentación ( $J(t)$ ). Como se desarrolló en el numeral 3.3.6., sin importar el historial de cargas, considerando que se aplica un esfuerzo lineal lento y que la respuesta obedece a un sólido viscoelástico; usando un indentador cilíndrico plano con radio  $a$ , y una muestra de espesor,  $h$ , se puede evaluar la relación Fuerza (F)-



Penetración ( $w$ ), tomando como base la ecuación Hayes *et al.* (Hayes *et al.* 1972). La deformación por *Compliance*  $J(t)$  se puede determinar a través de la Ecuación 16.

$$J(t) = \frac{4ak}{(1-\nu) \left[ \frac{dP}{dt} \right]} \frac{dw}{dt} \quad \text{Ecuación 16}$$

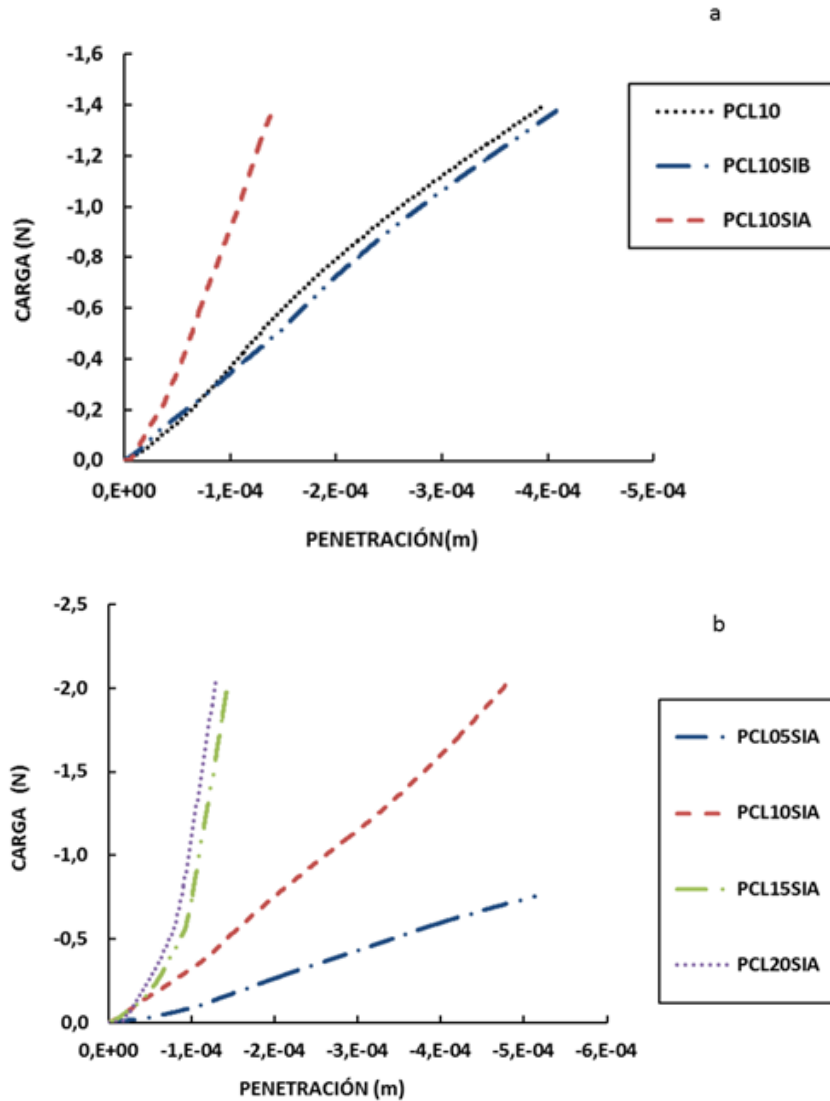
Al ver la Figura 32, el incremento de la resistencia a la tensión y la disminución de la deformación en la rotura en PCL10SIA en comparación con las membranas de PCL son bastante evidentes. Por el contrario, el comportamiento de PCL10SIB es más similar a PCL pura lo que se explica por la falta de continuidad de la fase de sílice. Sin embargo, el *composite* PCL10SIB muestra una deformación más pequeña en la rotura.

Es claro que existe una fuerte diferencia en la interacción entre las fases de sílice y polímero, cuando la reacción sol-gel es catalizada en medios ácidos o básicos. Esta interacción es evidente a partir de los experimentos de indentación presentados en la Figura 31a.

De hecho, la comparación de material compuesto de la membrana de PCL catalizada con ácido muestra que la fase de sílice produce un efecto de refuerzo en el material.

También se observó una disminución importante en el valor de la *Compliance* ( $J(t)$ ) y un incremento en el módulo elástico. Sin embargo, a grandes deformaciones se identificó sólo un efecto moderado. Si se compara el comportamiento mecánico de la indentación, del DMTA, y los experimentos de tracción, entre materiales compuestos producto de la catálisis básica y el de la PCL pura se observa que no hay diferencias apreciables. Es claro que si la fase inorgánica se forma en unas capas continuas sobre el polímero, como es el caso de los materiales compuestos catalizadas por ácido, se prevé una interacción más efectiva entre la sílice y PCL. En el caso de los materiales compuestos catalizadas por base, donde la morfología corresponde a microesferas discretas sobre la superficie del polímero, las posibilidades de interacción entre los componentes orgánicos e inorgánicos son más limitadas. Por lo tanto, cuando se aplica una carga mecánica en el material, la respuesta corresponde casi exclusivamente a la fase polimérica continua. No obstante, otros experimentos específicos podrían ser necesarios para evaluar las fuerzas de adhesión en interfase y para determinar cómo la interacción de sílice con polímero se ve afectada, en particular, por las condiciones de reacción sol-gel y topografía de la superficie del polímero.

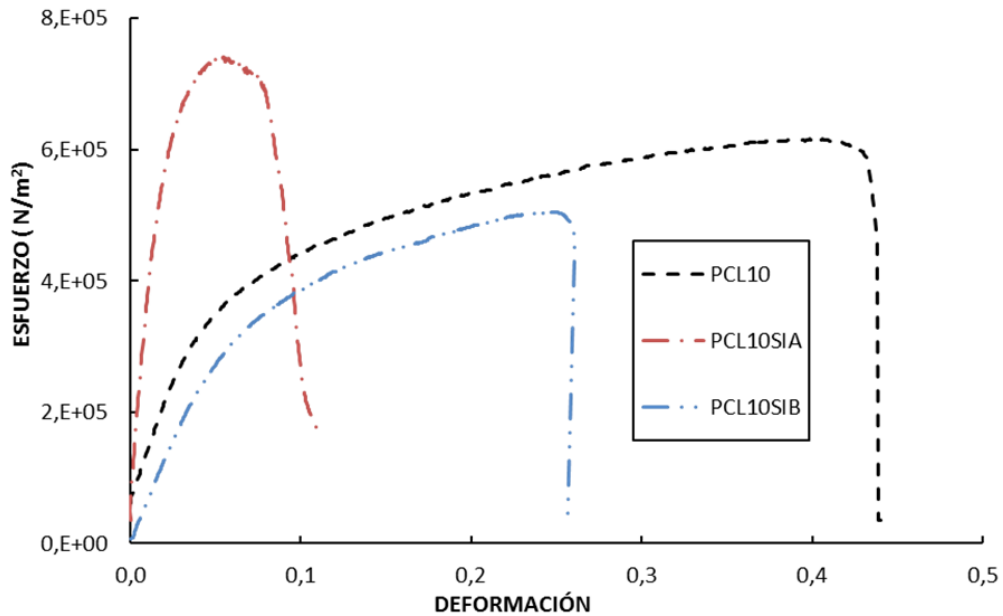
Es interesante observar que con el aumento de la porosidad de la membrana de PCL inicial hay una disminución de la *Compliance* de material compuesto (Figura 31b), que a su vez se relaciona con un incremento en el contenido de sílice en el material compuesto (Tabla 6).



**Figura 31** Curvas de carga-penetración resultantes de los ensayos de indentación en TMA para (a) PCL10, PCL10SIA y PCL10SIB (b) Influencia de la porosidad de la membrana PCL de partida en la rigidez de los composites. Tomada y traducida del original en Plazas *et al.* 2014.

En la Figura 32, se observa el aumento de la fuerza y la disminución de la tensión de rotura en PCL10SIA en comparación con las membranas de PCL. El comportamiento de PCL10SIB es más similar a PCL pura debido a la falta de continuidad de la fase de sílice, y adicionalmente muestra una deformación en la rotura más pequeña.

Con relación a los *composites* con quitosano y GPTMS, de igual forma probaron que el recubrimiento de sílice a través de la reacción sol-gel realmente refuerza las membranas de PCL, y permiten inferir que adicionalmente se puede variar o modular su dureza por variación de la relación sílice quitosano (Trujillo 2012, Trujillo *et al.* 2014).



**Figura 32** Curvas Esfuerzo- Deformación realizadas en equipo Microtester, para la membrana de PCL10 y los correspondientes materiales compuestos catalizados con ácido (PCL10SIA) y con base (PCL10SIB). Tomada y traducida del original en Plazas *et al.* 2014.

Tal como se ve en la Tabla 7, la relación usada para obtener el *scaffold* de PCL-SÍLICE presentó una porosidad similar al de la membrana PCL10. De igual manera, la porosidad obtenida para el *composite* PCL10SI<sub>scaff</sub> muestra una porosidad similar al de la membrana. Finalmente se debe resaltar que en relación con los materiales puros, el valor de la *Compliance* en los *composites* se afecta en un factor similar. Sin embargo, es necesario complementar la caracterización mecánica con la realización de otros ensayos que puedan evidenciar a través de la evaluación de otro parámetro o propiedad mecánica el efecto de la presencia de la sílice en el *scaffold*.

En general, vale la pena señalar que los resultados obtenidos en la fase de la experimentación a partir de los composites de las membranas porosas y su caracterización a través de los ensayos de porosidad, ángulo de contacto, contenido de sílice (obtenido por diferencia de peso, pirólisis y TGA), así como los resultados de propiedades morfológicas por SEM y el EDS de las membranas de PCL-SÍLICE son concordantes con las obtenidas en el estudio de los *scaffolds* PCL-SÍLICE. La realización de esta fase previa en lugar de abarcar directamente un material tipo *SCAFFOLD* resultó conveniente para tener un estudio más completo y disponer de elementos para poder hacer una propuesta para

producir *scaffolds* y abarcar así de manera más efectiva la investigación con materiales tridimensionales.

### 3.4.6. Ensayo de Bioactividad

Los polímeros sintéticos muy a menudo muestran una adhesión celular insuficiente; sus superficies son hidrofóbicas o débilmente hidrofílicas, lo que dificulta el crecimiento celular en una arquitectura tridimensional. Se ha observado que los grupos silanol tienden a ser más eficaces en inducir la formación de HAp en superficie que la sílice tratada térmicamente y altamente cristalina (Borum y Wilson 2003).

Con el fin de inferir respecto al comportamiento *in vivo* del material se realizó un ensayo *in vitro*: El ensayo de bioactividad. Su evaluación se realizó a través de las imágenes de SEM de las muestras de superficie después de uno, dos y tres semanas de inmersión en SBF. En las superficies de los compuestos polímero- sílice catalizadas en medio ácido se observó una morfología característica de deposición de apatita (parecido a la estructura de la coliflor). Después de dos semanas, la relación Ca: P que se puede asociar a la presencia de la apatita bioactiva, se evaluó en comparación con las muestras de PCL pura.

La Figura 33, muestra imágenes de SEM comparativas para PCLSIA y PCLSIB. El análisis elemental por EDS permitió confirmar la presencia de calcio y fósforo en la superficie de los *composites* y demuestra que la relación de Calcio / Fósforo al final del período de inmersión para el caso de PCL SIA fue mayor (entre 1.6 y 2.2) en comparación con PCL pura (~ 1.4).

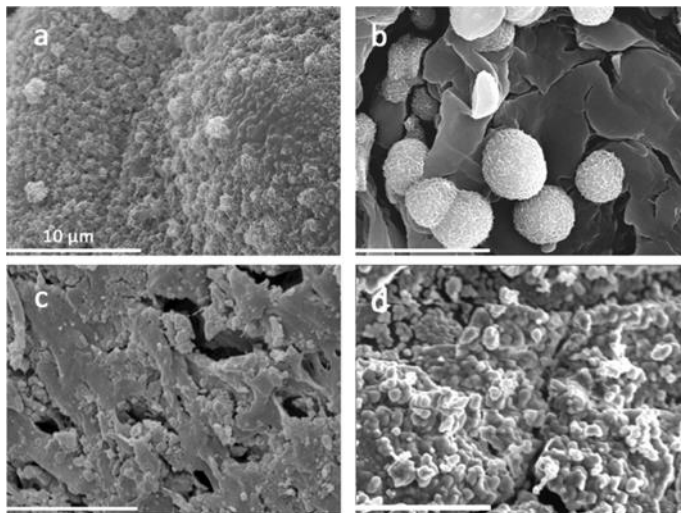
Se esperaba un aumento de la bioactividad de las membranas de material compuesto debido a la presencia de grupos silanol en las superficies del material (Vallés *et al.* 2009). Este resultado fue de hecho, el obtenido en la serie PCL15SIA. Sin embargo, el comportamiento de las muestras producidas por catálisis básica fue similar a la de PCL que se sabe que es un material no bioactivo. La Figura 33 muestra que la apariencia de los cristales de apatita formados en la superficie de la muestra PCL15SIA es el esperado para la hidroxiapatita biomimética.

En las superficies de PCL15SIB, los cristales adoptan una morfología diferente y también presentan proporciones de Ca/P menores (en promedio 1.1). Para la PCL pura, la cantidad de iones calcio y fósforo resultaban demasiado bajos y el cálculo de la relación de los porcentajes atómicos no ofrece un valor representativo.

Es importante citar que no se detectó formación de hidroxiapatita en los cortes transversales de las membranas, tal como lo evidencia la Figura 34. Por lo tanto, la renovación de iones de calcio y fósforo en el interior de las membranas de PCL en SBF parece ser insuficiente para permitir que los cristales de hidroxiapatita crezcan dentro de la estructura porosa.

Cuando se evaluó el cambio en el peso en las muestras, se encontró que las membranas de PCL pura aumentaron su peso por inmersión en SBF (debido a la deposición de apatita

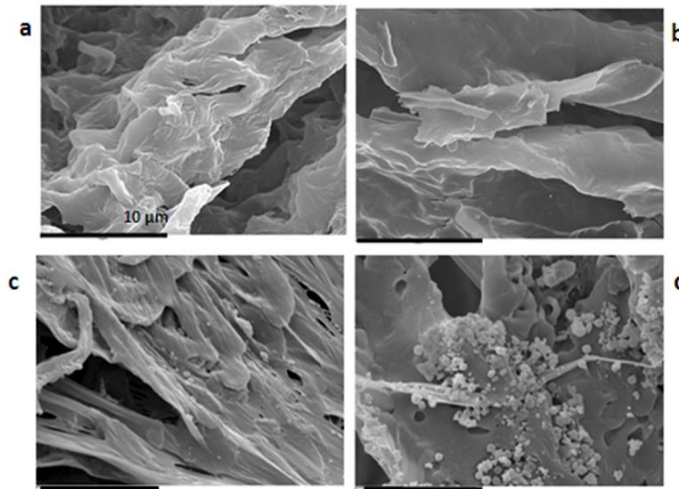
(Tabla 8). Sin embargo al observar los cambios de peso de las membranas PCLSIA es notoria su disminución, muy probablemente debido a la pérdida de sílice disuelto en el medio de SBF.



**Figura 33** Microfotografías de SEM de superficies de a) Membrana PCL15, b) PCL15SIA, después de tres semanas, c) Membrana PCL15 y d) PCL15SIB, después de dos semanas en SBF. La dimensión de la barra corresponde a 10 µm en todas las microfotografías. Tomada y traducida del original en Plazas *et al.* 2014.

**Tabla 8.** Variaciones de peso de los composites obtenidos en medio ácido en comparación con el control durante la inmersión en SBF.

Tiempo de inmersión	Material	% Cambio en el peso
Semana1	PCL10	$0.58 \pm 0.63$
	PCL10SIA	$-1.26 \pm 0.69$
Semana2	PCL10	$0.86 \pm 0.70$
	PCL10SIA	$-2.86 \pm 0.59$
Semana3	PCL10	$1.44 \pm 0.27$
	PCL10SIA	$-4.86 \pm 0.91$



**Figura 34** Microfotografías de SEM de cortes transversales de a) Membrana PCL15, b) PCL15SIA, después de tres semanas, de inmersión en SBF c) Membrana PCL15 y d) PCL15SIB, después de dos semanas en SBF. La barra corresponde a 10 µm.

Se puede por tanto establecer que el revestimiento de sílice de las paredes de los poros aumentan la humectabilidad con respecto a la PCL microporosa (Tabla 7), pero aun así la permeabilidad al agua no es tan fácil como lo demuestra la absorción de agua deficiente de las muestra secas de los *composites* al ser sumergidas en agua y los valores de ángulos de contacto con el agua.

Los ensayos realizados con células MC3T3-E1 por Sara Trujillo con el fin de evaluar la idoneidad de los híbridos que comprometían en su estructura la presencia de GPTMS y quitosano en la ingeniería de tejido óseo, consistieron en experimentos preliminares para comprobar la adhesión y propagación de estas células pre-osteoblásticas en las membranas de sustrato. En general, las células MC3T3-E1 se adhieren menos en las membranas de PCL, con relación al control de vidrio plano debido a la porosidad del sustrato. El tamaño de los poros en la superficie de la PCL es del orden de magnitud del de las propias células. Las células son capaces de encontrar puntos de adherencia en las proteínas adsorbidas del medio de cultivo en las trabéculas membrana y la posición de estos puntos de contacto entre las células y la superficie de material determinan la forma celular. Las membranas híbridas de sílice quitosano no favorecen la adhesión celular a las 2 y 6 horas de cultivo. Curiosamente, las membranas híbridas muestran una respuesta de células similar a las de la PCL. Según se concluye se requieren tiempos mayores de cultivo y estudios adicionales (Trujillo *et al.* 2014).

No se detectó ningún efecto citotóxico del material de revestimiento en estos estudios, ya que el número de células son similares en PCL y en las membranas híbridas.

Sin embargo, dado que las interacciones de las nano-partículas de sílice con las células dependen de su tamaño, composición química, estructura de la superficie, solubilidad y la forma cómo se aglomeran las nano-partículas individuales, se realizó una aproximación para evaluar la toxicidad, el efecto en la viabilidad celular y la actividad de ALP de células mesenquimales MSCs, y el efecto en la proliferación de células osteoblásticas. La respuesta biológica para estos compuestos se evaluó mediante el cultivo de células madre mesenquimales de la médula ósea en la superficie de los materiales compuestos. Estos estudios han sido publicados (Demirdögen *et al.* 2013).

En general, se concluyó que los *composites* obtenidos por catálisis ácida sostienen la adhesión y viabilidad de forma similar al polímero puro en el medio de expansión, mientras que esta se ve comprometida en los *composites* producidos en medio básico, probablemente debida a la rápida liberación de la sílice al medio. Por otra parte, se observaron diferencias significativas en el aumento del contenido de calcio y de la actividad de la fosfatasa alcalina para los dos *composites* (catalizados en medio ácido y en medio básico), con relación a los controles de PCL puro, del día 14 al 25. Ello sugiere que estos materiales mejoran el potencial osteogénico. Sin embargo estos resultados deberían confirmarse con experimentos en *scaffolds*.

Es importante resaltar que entre las características ventajosas de este tipo de materiales también se encuentra que con relación a la biodegradabilidad de los *composites* PCL-sílice se ha visto que cuando son implantados en el organismo existe la posibilidad de que la sílice permanezca después de la degradación de la PCL, la cual puede ser excretada del organismo tal como lo han reportado Lai *et al.* (Lai *et al.* 2002).





# CAPÍTULO 4. Conclusiones y Recomendaciones

## 4.1. Conclusiones

### 4.1.1 En relación con la técnica sol-gel

- La simplicidad y versatilidad de la técnica sol-gel *in situ* usada, admite visualizarla como una herramienta que combinada con variaciones de porosidad de estructuras poliméricas, permite obtener materiales compuestos los cuales demuestran el recubrimiento de los poros con una capa superficial de sílice. Es posible de esta forma obtener una variedad de propiedades mecánicas y físicas que se podrían modular en función de los requerimientos de un material, de su aplicación y manejo; constituyéndose estos resultados en elementos promisorios para uso en el campo de los materiales para regeneración ósea.
- El método sol-gel se confirma como un medio económico para obtener materiales compuestos con aplicaciones biomédicas, que adicionalmente por no requerir altas temperaturas permite su aplicación a polímeros que tengan una baja temperatura de fusión, de transición vítrea o baja termo resistencia.
- A través de un manejo cuidadoso bajo ciertas condiciones, las reacciones sol-gel permiten obtener productos con alto grado de pureza química que no involucran el uso de sustancias de alta toxicidad (catalizadores, solventes), ni conducen a subproductos de reacción con marcada toxicidad; permitiendo un muy buen control de los resultados de la reacción.
- Las reacciones sol-gel presentan como ventaja adicional la versatilidad en su manejo. Pueden utilizarse para realizar síntesis simultánea con un material polimérico,

para introducir una fase inorgánica posteriormente a la síntesis de una fase polimérica, como una fase sólida en mezcla con un polímero, dispersa en un solvente o en mezcla con un polímero, como un recubrimiento de una superficie polimérica en forma de capas o agregados (como se realizó en el presente trabajo), aplicada como una capa de recubrimiento mediante el uso de tecnologías *Spin* y *Deep coating*. Ello revela que puede adaptarse para obtener variedad de propiedades en forma de *composites* o híbridos y como en el caso de la presente investigación permite su aplicación sobre materiales de naturaleza diversa en cuanto a porosidad y propiedades hidrofílicas.

- En general no se ha conocido de compuestos obtenidos con los métodos planteados en este trabajo ni con la morfología que ellos presentan, que hayan sido propuestos en el campo de la regeneración y sustitución del tejido óseo.
- La posibilidad de introducir una fase inorgánica de sílice a un elemento previamente procesado y conformado en una matriz polimérica, abre la opción a facilitar la obtención de materiales a los que se les pueda conferir aumento de la bioactividad.

#### **4.1.2. En relación con los híbridos PHEA-SiO<sub>2</sub>**

- Se obtuvieron materiales híbridos orgánicos-inorgánicos de poli(hidroxietil acrilato)-sílice con contenidos de fase inorgánica entre ~20 y 60%.
- El procedimiento de introducción de la fase inorgánica que se diseñó tomando ventaja de la propiedad de la red porosa de los hidrogeles para absorber fases acuosas, de igual forma facilitó la distribución homogénea de la fase sílice en la red polimérica.
- A través de la aplicación de técnicas analíticas como la espectrometría FTIR y espectrometría de dispersión de rayos X, se logró evidenciar la formación de la fase SiO<sub>2</sub> en forma cualitativa en la red de los híbridos; mientras que técnicas del tipo TGA, pirólisis y evaluación gravimétrica antes y después de la reacción; permitieron cuantificar la fase de sílice en los materiales híbridos.
- La síntesis de los hidrogeles de PHEA usando etanol como solvente, permitió obtener una diversidad de porosidades que a su vez median en la cantidad de sílice que es posible introducir en el hidrogel. Esta situación ofrece la posibilidad de obtener una variedad de propiedades físicas y mecánicas, que al ser evaluadas pueden direccionar variedad de aplicaciones de los materiales PHEA-SÍLICE obtenidos.
- Las determinaciones relacionadas con la interacción de los materiales con el agua, como son el EWC y la aplicación de DSC para calcular el calor de fusión del agua cristalizada en los materiales híbridos hidratados se revelaron como técnicas que permitieron lograr una caracterización de los materiales poliméricos y los materiales híbridos obtenidos con el fin de evaluar en forma sencilla su porosidad, así como inferir como se presenta la distribución de la fase inorgánica en la fase polimérica del híbrido.

- La reproducibilidad de los ensayos de caracterización de los materiales híbridos obtenidos, permite establecer que la producción de la fase de sílice, a través de la reacción sol-gel catalizada en medio ácido en materiales tipo hidrogel como PHEA micro y macro poroso en la relación molar TEOS:Agua:Etanol:HCl de 1:15:1:0.0185, proporciona una distribución uniforme de la solución precursora, una buena reproducibilidad de la reacción en cuanto a la cantidad de fase inorgánica incluida en la red así como en la homogeneidad de la distribución de la misma dentro de los híbridos.
- La relación de reactantes planteada en la reacción sol-gel realizada dio lugar a la obtención de una red de sílice nanométrica y en forma de agregados del orden de los micrómetros. Hasta un contenido de sílice de alrededor del 20% se pudo establecer que la red inorgánica se filtra en la del hidrogel formando una red interpenetrada co-continua en nanodominios. Con contenidos mayores (alrededor del 30% en sílice, lo cual se relaciona con la porosidad del gel de partida); la fase inorgánica se presenta adicionalmente bajo la forma de agregados en los poros.
- La transparencia de los materiales híbridos PHEA-sílice obtenidos, es concordante con el tamaño de los agregados de sílice obtenidos y soporta la naturaleza química de la misma.
- La morfología micro y macroscópica del residuo producido en el ensayo de pirólisis, evidenció en forma contundente la continuidad de la fase inorgánica en los materiales híbridos PHEA-SÍLICE.
- La capacidad de absorción de agua de los hidrogeles se ve afectada en forma marcada cuando se introduce en ellos una fase de sílice. Sin embargo, si permanecen en la superficie de la sílice, grupos Si-OH no condensados, puede consecuentemente haber un menor efecto en la reducción de la capacidad de absorción de agua (esto en el caso de la red micro porosa, la cual presenta un menor contenido de sílice).
- El aumento en el contenido de sílice y la formación de redes co-continuas combinadas con los aglomerados de sílice en las redes de cadenas orgánicas, son los responsables de la limitación de la hidratación de los híbridos.
- Los análisis térmicos, calorimétricos y las medidas dinámico-mecánicas permiten evidenciar un ligero aumento en la temperatura de transición vítrea del polímero y una relajación mecánica asociada a temperaturas más altas, confirmando la estructura planteada de los híbridos y la restricción de la movilidad de las cadenas de polímero; muy probablemente por la distribución de la red de sílice.
- Al aumentar la porosidad en los hidrogeles de PHEA se manifiesta un aumento de la *Compliance*. Sin embargo, el refuerzo con sílice en los correspondientes híbridos PHEA- SÍLICE se refleja con una marcada disminución de la *Compliance* a un valor de aproximadamente el mismo orden.

- La presencia de sílice reduce la capacidad de movimiento molecular en las cadenas poliméricas, lo cual se refleja en las curvas de DSC en trazos más suaves y un intervalo más amplio en la transición vítrea.
- El aumento del módulo de almacenamiento en la zona de goma incrementa en el híbrido PHEA0SI debido a la interacción de la red de sílice con el material polimérico, lo cual corrobora el grado de dispersión de la fase inorgánica dentro de la matriz del hidrogel.
- Los nanohíbridos con contenidos de sílice intermedios (20 y 35 % en peso) muestran un equilibrio interesante entre el refuerzo mecánico alcanzado por las redes de sílice interpenetradas co-continuas y la capacidad de absorción de agua aún no obstaculizado por el esqueleto rígido de sílice.

#### 4.1.3. En relación con los composites PCL-SiO<sub>2</sub>

- Se obtuvieron materiales compuestos con una fase inorgánica de sílice y de un polímero de amplio reconocimiento dentro del ámbito de las aplicaciones biomédicas como es el PCL, aplicando un procedimiento económico y sencillo.
- Los *composites* orgánicos-inorgánicos de PCL-SÍLICE por catálisis ácida obtenidos, presentaron contenidos de fase inorgánica entre ~4 y 60 % m/m; en los cuales se demostró un aumento de las propiedades hidrofílicas que a su vez estimulan la bioactividad de los mismos.
- La reacción sol-gel que tuvo lugar en los microporos de la membrana de policaprolactona, en condiciones de catálisis ácida, utilizando TEOS como precursor de sílice se produce como un revestimiento de capa fina, homogéneo sobre las paredes de los poros y la superficie del material. Esta continuidad fue evidenciada por la morfología y la coherencia del material después eliminar la fase polimérica por un tratamiento de pirólisis.
- La reacción sol-gel con catalizador básico, produjo sílice en forma de partículas esféricas con diámetros del orden de los submicrones, las cuales se presentan como agregados dentro de los poros, las cuales son fácilmente liberadas de la membrana en un medio acuoso.
- El procedimiento propuesto de introducción de la fase inorgánica en la fase porosa de PCL, permitió contrarrestar sus propiedades hidrofóbicas favoreciendo la entrada por vacío, a su vez permitió una distribución homogénea de la fase sílice en la red polimérica, para el caso de la reacción en catálisis ácida.
- Las técnicas de análisis de espectrometría FTIR y espectrometría de dispersión de rayos X, permitieron demostrar cualitativamente la formación de la fase SiO<sub>2</sub> en la red polimérica de los *composites*; mientras que técnicas del tipo TGA, pirólisis y determinaciones gravimétricas antes y después de la reacción, permitieron evaluar cuantitativamente el contenido de la fase inorgánica.

- Con variaciones en la relación PCL y dioxano de las soluciones para preparar la membrana de PCL por el método *freeze extraction*, se logró obtener diversidad de porosidades de membrana de PCL, que a su vez influyeron en la cantidad de sílice que fue posible introducir en el material compuesto, brindando así la posibilidad de obtener una variedad de propiedades físicas y mecánicas, que al ser evaluadas permitirán direccionar la aplicación de los materiales obtenidos y la realización de nuevos experimentos.
- La producción de fase sílice resultado de la reacción sol-gel catalizada en medio ácido en membranas de PCL en la relación molar TEOS:Agua:Etanol:HCl de 1:2:1:0.0185, permitió una introducción uniforme de la solución precursora, una buena reproducibilidad de la reacción en cuanto a la cantidad de fase inorgánica incluida en los poros, así como homogeneidad en la distribución de la misma en los *composites*.
- La continuidad de la fase inorgánica en los materiales compuestos (membrana o *scaffolds*) obtenidos por catálisis ácida, se comprobó a través de la evaluación micro y macroscópica del residuo de pirólisis.
- Aunque se evidenció mejora en las propiedades de hidrofiliidad de la superficie del *composite* por el contenido relativo de grupos polares silanol, es importante en el momento de diseñar nuevas relaciones de reactantes y condiciones de la reacción, evaluar la conveniencia de la presencia de grupos silanoles libres a los propósitos del material.
- Los *composites* de PCL-SÍLICE con contenidos de sílice intermedios, muestran un equilibrio interesante de valorar entre el refuerzo mecánico logrado por la capa de sílice y la capacidad de absorción de agua aumentada por el contenido de la misma y la presencia de grupos SiOH no condensados.
- Una primera aproximación para la producción de un recubrimiento de sílice menos rígido sobre estructuras porosas de PCL se logró usando quitosano y el precursor de sílice 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GPTMS), en procura de lograr una unión de las cadenas poliméricas a la sílice pretendiendo que al lograr el enlace químico entre los grupos amina del quitosano y los grupos epoxi del GPTMS, se haga más estable la fase sílice dentro del material y exalte las propiedades mecánicas relacionadas con la dureza.
- El modelo planteado como fase previa para la obtención de un material compuesto PCL-SÍLICE de naturaleza tridimensional (*scaffolds*) así como los ensayos planeados para su caracterización a través la elaboración de membranas; permitieron verificar que hay un alto grado de concordancia tanto en el resultado de la aplicación del método de fabricación como en las propiedades físicas con las que cuenta el *scaffold* resultante. Es necesario que se complemente su caracterización y se optimice la selección de la relación PCL: porógeno de tal forma que una vez seleccionada la porosidad ideal del *scaffold* (la cual afectará el contenido de sílice en el *composite*); se evalúe su desempeño *in vitro* usando cultivos celulares que cumplan con los requerimientos que para este tipo de estructuras son necesarios si se desea obtener resultados concluyentes.

#### 4.1.4. Con relación al estudio con células

- Los cultivos celulares realizados sobre estructuras tipo membrana de PCL, demostraron que las células se adhieren y proliferan en los *composites* con sílice, sin embargo es necesario realizar estudios más profundos al respecto y con estructuras tridimensionales los cuales requieren de un planteamiento más exigente y controlado para la obtención de resultados concluyentes.
- De acuerdo con los resultados de los ensayos realizados el laboratorio TEBN (*Tissue Engineering and Biomaterials*) de la Universidad de Ankara, Turquía, los materiales compuestos PCL y sílice producto de la catálisis ácida, favorecen el mantenimiento de adhesión y la viabilidad de las células madre mesenquimales de manera similar a PCL puro; mientras que la viabilidad se ve comprometida significativamente en los materiales compuestos producidos con medio básico.
- Las pruebas usadas para evaluar la deposición mineral y diferenciación en cultivo de células en condiciones osteogénicas, mostraron una más alta actividad de mineralización con los materiales compuestos que con la PCL pura conduciendo a una diferenciación osteoblástica de las células MSCs.

## 4.2. Recomendaciones

- Con el procedimiento aplicado y la relación de reactantes de la solución precursora en la reacción sol-gel usada para la introducción de la fase de sílice en la red del polímero PHEA; se podría plantear modificar en cierto grado la temperatura de envejecimiento ya que al aumentarla, se esperaría favorecer una mayor condensación de la red de sílice.
- Dado que la cinética de degradación de la PCL se puede alterar por la presencia de la fase inorgánica, es mandatorio la realización de ensayos de degradación en función de la aplicación prevista.
- Se sugiere continuar el estudio de la aplicación de las reacciones sol-gel en busca de la mejora de propiedades físicas y mecánicas mediante variaciones controladas en las condiciones de reacción.

- Se propone realizar estudios de liberación de la sílice de los diferentes materiales híbridos y compuestos obtenidos y evaluar las posibles acciones tóxicas y los cambios en las propiedades físicas.
- Dado que uno de los inconvenientes del método sol-gel es que es fuertemente sensible a ligeros cambios en la composición de las soluciones precursoras, es importante que con base en los resultados obtenidos y las relaciones usadas se planteen en nuevas propuestas para controlar las velocidades de hidrólisis y condensación. Por ejemplo se plantea realizar investigaciones que involucren el uso de otros componentes que por su naturaleza controlan la reactividad de los precursores, tales como ácidos carboxílicos, cetonas, alcoholes, permitiendo modular ciertas propiedades morfológicas y estructurales. Sin embargo debe intentar mantenerse en lo posible el uso de componentes de baja toxicidad e impacto ambiental con el fin de hacer de estos estudios herramientas que controlen la generación de contaminación y efectos negativos al medio ambiente y a los usuarios.
- Dado que el planteamiento final que se persigue es una estructura morfológica tipo *scaffold*; la evaluación de las propiedades mecánicas y biológicas deben efectuarse de manera más extensa una vez se logre optimizar la relación de PCL: porógeno que permita un material con un buen balance entre las propiedades mecánicas y biológicas buscadas y además se debe complementar el estudio con cultivos de células y ensayos *in vivo*, en condiciones adecuadas para la evaluación de materiales tridimensionales.





## A. Anexo: Selección de las condiciones para realizar la reacción Sol-Gel

Las consideraciones involucradas para la introducción de la fase inorgánica en el hidrogel PHEA por medio de la absorción de una fase líquida hidrófila, incluyeron que la solución se mantuviera homogénea y sin signos de gelificación durante el proceso de absorción, es decir en forma de solución durante las 24 horas de absorción. Sabiendo que el tiempo de gelificación en las reacciones sol-gel varía entre ser instantáneas a tardar varios horas o aún días; entonces se tomaron en cuenta varios estudios relacionados con las diferentes condiciones ensayadas para la reacción sol-gel y su comportamiento (Park *et al.* 2002, Rahman *et al.* 2006, Musgo *et al.* 2009, Phadungsukanan *et al.* 2009, Yan *et al.* 2010).

Como punto de partida, se señaló el uso de TEOS como precursor de sílice, por lo que se evaluó la influencia de tres parámetros: el pH (por el uso de ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH)), la proporción molar de agua: TEOS y el efecto de la presencia / ausencia de etanol como disolvente en la velocidad de gelificación. Este último toma en cuenta que el alcohol es un factor que mejora la calidad del gel de sílice preparada. En estos primeros diseños experimentales el objetivo fue evaluar la evolución de la reacción y el inicio de tiempo de gelificación.

**Tabla 1.** Relación de reactantes de la solución precursora y resultados. Primer ensayo

RECIPIENTE	Presencia de etanol	Relación molar agua: TEOS 2 :1 o 40:1	Relación molar ácido o base: TEOS	Concentración aprox. en HCl o en NH <sub>3</sub>	pH inicio y final	Apariencia de la solución después de 72 horas
1	SI 10 mol ETOH:1 mol TEOS )	2:1	ACIDO 0.0185 mol HCl: 1.0 mol TEOS	0.0219 M	5.5	Translúcida
2	SI 10 mol ETANOL:1 mol TEOS	2:1	BASICO 0.60 mol NH <sub>3</sub> : 1.0 mol TEOS	0.6987 M	9.5	Precipitación gruesa difícil de redispersar
3	SI 10 mol ETANOL:1 mol TEOS	40:1	ACIDO 0.0185 mol HCl: 1.0 mol TEOS	0.0121 M	2.0-2.5	Translúcida

4	SI 10 mol ETANOL:1 mol TEOS	40:1	BASICO 0.60 mol NH <sub>3</sub> : 1.0 mol TEOS	0.3889 M	9.0→10.5	Precipitación con partículas muy finas
5	NO	2:1	ACIDO 0.0185 mol HCl: 1.0 mol TEOS	0.0711 M	5.5→1.0	Precipitación con partículas gruesas con sedimento de difícil redispersión
6	NO	2:1	BASICO 0.60 mol NH <sub>3</sub> : 1.0 mol TEOS	2.1830 M	9.5-10	Formación sólida compacta
7	NO	40:1	ACIDO 0.0185 mol HCl: 1 mol TEOS	0.0196 M	0.5→1.5	Ligera precipitación.
8	NO	40:1	BASICO 0.60 mol NH <sub>3</sub> : 1.0 mol TEOS	0.6258 M	9.0-9.5	Solución ligeramente turbia.

Una vez obtenidos los primeros resultados, se tomaron algunas acciones y se realizaron dos grupos de ensayos así:

**Tabla 2.** Relación de reactantes solución en la solución precursora y resultados en medio ácido. Segundo ensayo –Parte A.

RECIPIENTE	PRESENCIA DE ETANOL (Si está presente, es en relación 1 mol ETANOL:1 mol TEOS)	RELACION MOLAR AGUA: TEOS 10 mol :1 mol o 40 mol :1 mol	Cantidad de ácido (0.0185 mol HCl: 1 mol TEOS) o (0.037 mol HCl: 1 mol TEOS)	pH a 24 horas.	Apariencia de la solución a las 2h, 24 h. y después de calentar a 60°C.
1	SI ( 1: 1)	10: 1	0.0185	1.5	24 Horas: Translúcida 60°C * 24 horas: Sólido muy translúcido, transparente.
2	SI ( 1: 1)	10: 1	0.037:	0.5	24 horas: Formó sedimento escaso 60°C * 24 horas: Sólido muy blancuzco transparente.
3	SI ( 1: 1)	40:1	0.0185	2.0	24 horas: Translúcida 60°C * 24 horas: Translúcida
4	SI ( 1: 1)	40:1	0.037	2.0	24 horas: Translucida 60°C * 24 horas: Solución translúcida

5	NO	10:1	0.0185	1.5	24 horas: Formó un aro en la superficie. 60°C * 24 horas: Sólido translúcido, transparente.
6	NO	10:1	0.037	1.5	24 horas: Formó una capa de sedimento 60°C * 24 horas: Sólido ligeramente turbio.
7	NO	40:1	0.0185	1.5-2.0	24 horas: Translúcida 60°C * 24 horas: Translúcida
8	NO	40:1	0.037	1.5-2.0	24 horas: Translúcida 60°C * 24 horas: Translúcida

**Tabla 3.** Relación de reactantes de la solución precursora y resultados en medio básico. Segundo ensayo – Parte B.

RECIPIENTE	CANTIDAD DE ETANOL 2 mol ETANOL:1 mol TEOS O 10 mol ETANOL:1 mol TEOS	RELACIÓN AGUA: TEOS 5 mol H <sub>2</sub> O:1 mol TEOS O 40 mol H <sub>2</sub> O:1 mol TEOS	RELACIÓN BASE : TEOS 0.60 mol NH <sub>3</sub> : 1.0 mol TEOS O 1.0 mol NH <sub>3</sub> : 1,0 mol TEOS	pH inicio y a las 24 horas	Apariencia de la solución 24 h. y después de calentar a 60°C
1	2: 1	5: 1	0.60 mol NH <sub>3</sub>	11	24 Horas: Sedimento compacto 60°C * 24 horas:: Sedimento compacto
2	2: 1	5: 1	1.0 mol NH <sub>3</sub>	10	24 Horas: Sedimento compacto 60°C * 24 horas: Sedimento compacto
3	2: 1	40: 1	0.60 mol NH <sub>3</sub>	9.5	24 Horas: Ligera turbidez 60°C * 24 horas: Suspensión muy fluida ligeramente blanca

4	2: 1	40:1	1.0 mol NH <sub>3</sub>	10	24 Horas: Turbidez ligera pero mayor que 3. 60°C * 24 horas: Suspensión fluida pero más turbia que 3.
5	10: 1	5:1	0.60 mol NH <sub>3</sub>	10.5	24 Horas: Suspensión homogénea fina 60°C * 24 horas: Suspensión blanca turbia partículas finas con sedimento.
6	10: 1	5:1	1.0 mol NH <sub>3</sub>	10.5	24 Horas: Suspensión homogénea más fina que 5. 60°C * 24 horas: Debido a que la tapa salto se obtuvo un polvo fino en el fondo.
7	10: 1	40:1	0.60 mol NH <sub>3</sub>	9.5	24 Horas: Suspensión homogénea más gruesa que 6( sedimento y anillo en la superficie) 60°C * 24 horas: Suspensión líquida no forma sedimento
8	10: 1	40:1	1.0 mol NH <sub>3</sub>	10.5	24 Horas: Suspensión de partículas muy finas. Aspecto lechoso 60°C * 24 horas: Suspensión líquida no forma sedimento

Después de evaluar la evolución de la reacción sol-gel en ambos medios, se decidió continuar con la reacción en medio ácido para el PHEA. El siguiente objetivo era conocer la influencia de la cantidad de ácido clorhídrico, la cantidad de agua y la cantidad de etanol en la solución de reacción (todos ellos en función de la cantidad de TEOS). La respuesta medida fue la homogeneidad de cantidad de fase orgánica obtenida (midiendo el aumento de peso), el aspecto macroscópico y la uniformidad de las membranas finales. Entonces, se diseñaron experimentos factoriales con el fin de seleccionar las mejores condiciones de reacción y así probar la absorción de la fase inorgánica en las diversas membranas.

Usando una temperatura de reacción de 37 °C agitación continua de los matraces de reacción y una temperatura de secado de 40 °C, se evaluaron los tres parámetros seleccionados: concentración de ácido, la relación de Etanol:TEOS y la relación de Agua:TEOS.

Tomando como base que estos factores no son independientes, se realizó un diseño factorial de 3 factores y dos niveles, utilizando ocho posibles combinaciones de ensayo. Un ejemplo del diseño experimental se presenta en la Tabla 4.

Una vez estandarizada las condiciones de reacción, el siguiente paso fue aplicar el procedimiento por quintuplicado: En un matraz de vidrio de volumen adecuado, la cantidad de TEOS se mezcló con la cantidad establecida de etanol, se agita durante 5 min, después se añadió la cantidad de ácido clorhídrico a la solución y se agita durante 60 min para así homogeneizar la solución. Después de ese tiempo, con un tamaño adecuado membranas PHEA pesada con porosidad variada, manteniendo la relación peso de la película: al volumen de la solución en (1:10), se introdujeron en la solución sol-gel en agitación continua a temperatura ambiente durante 24 horas. Después las membranas se sometieron a un lavado final con una mezcla de etanol y agua (1:10), se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas y finalmente se calentaron durante 24 horas a 40 °C.

**Tabla 4.** Factores y niveles de estos factores utilizados para evaluar las condiciones de la reacción sol-gel durante la absorción. El diseño experimental, se propone en función de los resultados anteriores (relación molar fija de TEOS:Etanol (1:1), lavado con solución de Etanol: Agua (1:10)).

Recipiente	Relación Molar Agua: TEOS	Relación molar ACIDO(HCl 10%): TEOS	Lavado final
1	10: 1	0.0185: 1	SI
2	10: 1	0.0185: 1	NO
3	10: 1	0.025: 1	SI
4	10: 1	0.025: 1	NO
5	15:1	0.0185: 1	SI
6	15:1	0.0185: 1	NO
7	15:1	0.025: 1	SI
8	15:1	0.025: 1	NO



# Bibliografía

- ABBAH, S.A., LAM, C.X.L., HUTMACHER, D.W., GOH, J.C.H. and WONG, H., 2009. Biological performance of a polycaprolactone-based scaffold used as fusion cage device in a large animal model of spinal reconstructive surgery. *Biomaterials*, **30**(28), pp. 5086-5093.
- ARAFAT, M.T., LAM, C.X.F., EKAPUTRA, A.K., WONG, S.Y., LI, X. and GIBSON, I., 2011. Biomimetic composite coating on rapid prototyped scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, **7**(2), pp. 809-820.
- ARAÚJO, N., GOMES, D., GÓMEZ RIBELLES, J.L., MONLEÓN PRADAS, M. and MANO, J., 2006. Dynamic-mechanical behavior of hydrophobic-hydrophilic interpenetrating copolymer networks. *Polymer Engineering and Science*, **46**(7), pp. 930-937.
- ARCOS, D. and VALLET-REGÍ, M., 2010. Sol-gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, **6**(8), pp. 2874-2888.
- AVELLA, M., ERRICO, M.E., LAURIENZO, P., MARTUSCELLI, E., RAIMO, M. and RIMEDIO, R., 2000. Preparation and characterisation of compatibilised polycaprolactone/starch composites. *Polymer*, **41**(10), pp. 3875-3881.
- BAINO, F. and VITALE-BROVARONE, C., 2011. Three-dimensional glass-derived scaffolds for bone tissue engineering: Current trends and forecasts for the future. Review. *Journal of Biomedical Materials Research A*, **97A**(4), pp. 514-535.
- BESBES, M., FAKHFAKH, N. and BENZINA, M., 2009. Characterization of silica gel prepared by using sol-gel process. *Physics Procedia*, **2**(3), pp. 1087-1095.

- BIDE, M., PHANEUF, M., BROWN, P., MCGONIGLE, G. and LOGERFO, F., 2006. Modification of Polyester for Medical Uses. In: J.V. EDWARDS, BUSCHLE-DILLER, G. and S.C. GOHEEN, eds, *Modified Fibers with Medical and Specialty Applications*. pp. 91-124.
- BIKIARIS, D.N., NIANIAS, N.P., KARAGIANNIDOU, E.G. and DOCOSLIS, A., 2012. Effect of different nanoparticles on the properties and enzymatic hydrolysis mechanism of aliphatic polyesters. *Polymer Degradation and Stability*, **97**(10), pp. 2077-2089.
- BOHNER, M. and LEMAITRE, J., 2009. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? *Biomaterials*, **30**(12), pp. 2175-2179.
- BOISVERT, J.P., PERSELLO, J. and GUYARD, A., 2003. Influence of the surface chemistry on the structural and mechanical properties of silica -polymer composites. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, **41**(23), pp. 3127-3138.
- BORUM, L. and WILSON JR., O.C., 2003. Surface modification of hydroxyapatite. Part II. Silica. *Biomaterials*, **24**(21), pp. 3681-3688.
- BOSE, S., ROY, M. and BANDYOPADHYAY, A., 2012. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in biotechnology*, **30**(10), pp. 546-554.
- BRINKER, C. and SHERER, G., 1990. *Sol-Gel Science. The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Primera edición edn. San Diego, CA 92101: Academic Press Inc.
- BRINKER, C.J., KEEFER, K.D., SCHAEFER, D.W. and ASHLEY, C.S., 1982. Sol-gel transition in simple silicates. *Journal of Non-Crystalline Solids*, **48** (1), pp. 47-64.
- CALANDRELLI, L., ANNUNZIATA, M., DELLA RAGIONE, F., LAURIENZO, P., MALINCONICO, M. and OLIVA, A., 2010. Development and performance analysis of PCL/silica nanocomposites for bone regeneration. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, **21**(11), pp. 2923-2936.
- CANNILLO, V., CHIELLINI, F., FABBRI, P. and SOLA, A., 2010. Production of Bioglass® 45S5 – Polycaprolactone composite scaffolds via salt-leaching. *Composite Structures*, **92**(8), pp. 1823-1832.
- CASTELVETRO, V. and DE VITA, C., 2004. Nanostructured hybrid materials from aqueous polymer dispersions. *Advances in Colloid and Interface Science*, **108-109**, pp. 167-185.
- CASTILLA CORTAZAR, I., VIDAURRE, A., GALLEGO FERRER, G., MONLEÓN PRADAS, M., GÓMEZ RIBELLES, J.L. and MESEGUER DUEÑAS, J.M., 2001. Hydrophilic sponges based on poly(hydroxyethyl acrylate). *Journal of Non Crystalline Solids*, **287**(1-3), pp. 130-134.
- CHIM, H., HUTMACHER, D.W., CHOU, A.M., OLIVEIRA, A.L., REIS, R.L., LIM, T.C. and SCHANTZ, J.-., 2006. A comparative analysis of scaffold material modifications for load-bearing applications in bone tissue engineering. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, **35**(10), pp. 928-934.



- CHOUZOURI, G. and XANTHOS, M., 2007. In vitro bioactivity and degradation of polycaprolactone composites containing silicate fillers. *Acta Biomaterialia*, **3**(5), pp. 745-756.
- COSTANTINI, A., LUCIANI, G., ANNUNZIATA, G., SILVESTRI, B. and BRANDA, F., 2006. Swelling properties and bioactivity of silica gel/pHEMA nanocomposites. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **17**(4), pp. 319-325.
- CROLL, T., O'CONNOR, A.J., STEVENS, G.W. and COOPER-WHITE, J.J., 2005. Controllable Surface Modification of Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) by Hydrolysis or Aminolysis I: Physical, Chemical, and Theoretical Aspects. *Biomacromolecules*, **5**(2), pp. 463-473.
- DASH, M., CHIELLINI, F., OTTENBRITTE, R.M. and CHIELLINI, E., 2011. Chitosan- A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, **36**(8), pp. 981-1014.
- DE LONG W.G. JR, EINHORN T.A., KOVAL, K., MCKEE, M., SMITH, W., SANDERS, R. and WATSON, T., 2007. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *Journal of Bone and Joint Surgery. American volumen*, **89**(3), pp. 649-658.
- DEB, S., MANDEGARAN, R. and DI SILVIO, L., 2010. A porous scaffold for bone tissue engineering/45S5 Bioglass® derived porous scaffolds for co-culturing osteoblasts and endothelial cells. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, **21**(3), pp. 893-905.
- DEMIRDOĞEN, B., PLAZAS, C.E., TRUJILLO, S., PERILLA, J.E., ELCIN, A.E., ELCIN, Y.M. and GOMEZ RIBELLES, J.L., 2013. Silica coating of the pore walls of a microporous polycaprolactone membrane to be used in bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, Journal doi: 10.1002/jbma.34999.
- DEVREUX, F., BARBOUX, P., FILOCHE, M. and SAPOVAL, B., 2001. A simplified model for glass dissolution in water. *Journal of Materials Science*, **36**(6), pp. 1331-1341.
- DI MARTINO, A., SITTINGER, M. and RISBUD, M.V., 2005. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, **26**(30), pp. 5983-5990.
- DONTH, E., BEINER, M., REISSING, S., KORUS, J., GARWE, F., VIEWEG, S., KAHLE, S., HEMPEL, E. and SCHRÖTER, K., 1996. Fine structure of the main transition in amorphous polymers: Entanglement, spacing and characteristic length of the glass transition. Discussion of Examples. *Macromolecules*, **29**(20), pp. 6589-6600.
- DREVELLE, O., BERGERON, E., SENTA, H., LAUZON, M.A., ROUX, S., GRENIER, G. and FAUCHEUX, N., 2010. Effect of functionalized polycaprolactone on the behaviour of murine preosteoblasts. *Biomaterials*, **31**(25), pp. 6468-6476.
- DUTTA, P.K., RINKI, K. and DUTTA, J., 2011. Chitosan: A Promising Biomaterial for Tissue Engineering Scaffolds. In: R. JAYAKUMAR, M. PRABAHARAN and R.A.A. MUZZARELLI, eds, *Chitosan for Biomaterials II*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 45-79.

- EGLIN, D., MAALHEEM, S., LIVAGE, J. and CORADIN, T., 2006. In vitro apatite forming ability of type I collagen hydrogels containing bioactive glass and silica sol-gel particles. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **17**(2), pp. 161-167.
- ELBERT, D.L., 2011. Liquid-liquid two-phase systems for the production of porous hydrogels and hydrogel microspheres for biomedical applications: A tutorial review. *Acta Biomaterialia*, **7**(1), pp. 31-56.
- ESHLAGHI, S. and DAS, S., 2010. Mechanical and microstructural properties of polycaprolactone scaffolds with one-dimensional, two-dimensional, and three-dimensional orthogonally oriented porous architectures produced by selective laser sintering. *Acta Biomaterialia*, **6**(7), pp. 2467-2476.
- FABBRI, P., SINGH, B., LETERRIER, Y., MANSON, J.A.E., MESSORI, M. and PILATI, F., 2006. Cohesive and adhesive properties of polycaprolactone/silica hybrid coatings on poly(methyl methacrylate) substrates. *Surface and Coatings Technology*, **200**(24), pp. 6706-6712.
- FABBRI, P., CANNILLO, V., SOLA, A., DORIGATO, A. and CHIELLINI, F., 2010. Highly porous polycaprolactone-45S5 Bioglass® scaffolds for bone tissue engineering. *Composites Science and Technology*, **70**(13), pp. 1869-1878.
- FENG, J., YAN, W., GOU, Z., WENG, W. and YANG, D., 2007. Stimulating effect of silica-containing nanospheres on proliferation of osteoblast-like cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **18**(11), pp. 2167-1172.
- GALLEGO FERRER, G., MONLEÓN PRADAS, M., GÓMEZ RIBELLES, J.L. and PISSIS, P., 1998. Swelling and thermally stimulated depolarization currents in hydrogels formed by interpenetrating polymer networks. *Journal of Non-Crystalline Solids*, **235-237**, pp. 692-696.
- GALLEGO FERRER, G., MONLEÓN PRADAS, M., GÓMEZ RIBELLES, J.L. and SALMERÓN SÁNCHEZ, M., 2004. Thermodynamical analysis of the hydrogel state in poly(2-hydroxyethyl acrylate). *Polymer*, **45**(18), pp. 6207-6217.
- GALLEGO FERRER, G., SALMERÓN SÁNCHEZ, M., GÓMEZ RIBELLES, J.L., ROMERO COLOMER, F. and MONLEÓN PRADAS, M., 2007. Nanodomains in a hydrophilic-hydrophobic IPN based on poly(2-hydroxyethyl acrylate) and poly(ethyl acrylate). *European Polymer Journal*, **43**(8), pp. 3136-3145.
- GAMBOA, T.C., GÓMEZ, J.L. and GALLEGÓ, G., 2011. Fibrin coating on poly (L-lactide) scaffolds for tissue engineering. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, **26**(5), pp. 464-477.
- GAONA, L.A., GÓMEZ RIBELLES, J.L., PERILLA, J.E. and LEBOURG, M., 2012. Hydrolytic degradation of PLLA/PCL microporous membranes prepared by freeze extraction. *Polymer Degradation and Stability*, **97**(9), pp. 1621-1632.
- GARCÍA CRUZ, D.M., GOMES, M., REIS, R.L., MORATAL, D., SALMERÓN-SÁNCHEZ, M., GÓMEZ RIBELLES, J.L. and MANO, J.F., 2010. Differentiation of mesenchymal stem cells in

chitosan scaffolds with double micro and macroporosity. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **95A**(4), pp. 1182-1193.

GARCÍA CRUZ, D.M., ESCOBAR IVIRICO, J.L., MONLEÓN, M., GÓMEZ RIBELLES, J.L., SALMERÓN SÁNCHEZ, M., REIS, R.L. and MANO, J.F., 2008. Chitosan microparticles as injectable scaffolds for tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **2**(6), pp. 378-380.

GARCÍA, D.M., 2008. *Materiales macroporosos biodegradables basados en quitosano para la ingeniería tisular*, Universidad Politécnica de Valencia,.

GÓMEZ RIBELLES, J.L., VIDAURRE GARAYO, A., COWIE, J.M.G., FERGUSON, R., HARRIS, S. and MCEWEN, I.J., 1998. The length of cooperativity at the glass transition in poly(vinyl acetate) from the modelling of the structural relaxation process. *Polymer*, **40**(1), pp. 183-192.

GUPTA, A.P. and KUMAR, V., 2007. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – Polylactide: A critique. *European Polymer Journal*, **43**(10), pp. 4053-4074.

GURAV, J.L., JUNG, I., PARK, H., KANG, E.S. and NADARGI, D.Y., 2010. Silica Aerogel: Synthesis and Applications. Review Article. *Journal of Nanomaterials*, Journal doi:10.1155/2010/409310.

HAJJI, P., DAVID, L., GERARD, J.F., PASCAULT, J.P. and VIGIER, G., 1999. Synthesis, structure, and morphology of polymer-silica hybrid nanocomposites based on hydroxyethyl methacrylate. *Journal of Polymer Science. Part B, Polymer Physics*, **37**(22), pp. 3172-3187.

HAYES, W.C., KEER, L.M., HERRMANN, G. and MOCKROS, L.F., 1972. A Mathematical analysis for indentation test of articular cartilage. *Journal of Biomechanics*, **5**(5), pp. 541-551.

HENCH, L.L., 2006. The story of Bioglass. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **17**(11), pp. 967-978.

HENCH, L. and WEST, J., 1990. The Sol-Gel Process. *Chemical Reviews*, **90**(1), pp. 33-72.

HOFFMAN, A., 1996. Classes of materials used in Medicine. In: RATNER, B., HOFFMAN, A., SCHOEN, F., LEMONS, J., ed, *Biomaterials Science, An Introduction to Materials in Medicine*. 2nd Edition edn. Estados Unidos: Elsevier Academic Press Inc, pp. 124-132.

HOFFMAN, A.S., 2002. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **54**(1), pp. 3-12.

HOPPE, A., GÜLDAL, N.S. and BOCCACCINI, A.R., 2011. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*, **32**(11), pp. 2757-2774.

HUANG, S., CHIN, W. and YANG, W.P., 2005. Structural characteristics and properties of silica/poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) nanocomposites prepared by mixing colloidal silica or tetraethyloxysilane (TEOS) with PHEMA. *Polymer*, **46**(6), pp. 1865-1877.

- HUTCHENS, S.A., BENSON, R.S., EVANS, B.R., O'NEILL, H.M. and RAWN, C.J., 2006. Biomimetic synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in a natural hydrogel. *Biomaterials*, **27**(26), pp. 4661-4670.
- HUTMACHER, D.W., SCHANTZ, T., ZEIN, I., NG, K.W., TEOH, S.H. and TAN, K.C., 2001. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *Journal of Biomedical Materials Research*, **55**(2), pp. 203-216.
- JAAKKOLA, T., RICH, J., TIRRI, T., NÄRHI, T., JOKINEN, M., SEPPÄLÄ, J. and YLI-URPO, A., 2004. *In vitro* Ca-P precipitation on biodegradable thermoplastic composite of poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-DL-lactide) and bioactive glass (S53P4). *Biomaterials*, **25**(4), pp. 575-581.
- JALOTA, S., BHADURI, S.B. and TAS, A.C., 2006. Effect of carbonate content and buffer type on calcium phosphate formation in SBF solutions. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **17**(8), pp. 697-707.
- JONES, J.R., 2013. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia*, **9**(1), pp. 4457-4486.
- KAKWERE, H. and PERRIER, S., 2011. Design of complex polymeric architectures and nanostructured materials/hybrids by living radical polymerization of hydroxylated monomers. *Polymer Chemistry*, **2**, pp. 270-288.
- KAWAI, T., OHTSUKI, C., KAMITAKAHARA, M., HOSOYA, K., TANIHARA, M., MIYAZAKI, T., SAKAGUCHI, Y. and KONAGAYA, S., 2007. *In vitro* apatite formation on polyamide containing groups modified with silanol groups. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **18**(6), pp. 1037-1042.
- KIM, H.M., HIMENO, T., KAWASHITA, M., KOKUBO, T. and NAKAMURA, T., 2004. The mechanism of biomineralization of bone-like apatite on synthetic hydroxyapatite: an *in vitro* assessment. *Journal of the Royal Society Interface*, **1**(1), pp. 17-22.
- KIM, H.M., HIMENO, T., KOKUBO, T. and NAKAMURA, T., 2005. Process and kinetics of bonelike apatite formation on sintered hydroxyapatite in a simulated body fluid. *Biomaterials*, **26**(21), pp. 4366-4373.
- KIM, I.Y., SEO, S.J., MOON, H.S., YOO, M.K., PARK, I.Y., KIM, B.,C. and CHO, C.S., 2008. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology advances*, **26**(1), pp. 1-21.
- KOKUBO, T., 1991. Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials*, **12**(2), pp. 155-163.
- KOKUBO, T., 2005. Design of bioactive bone substitutes based on biomineralization process. *Materials Science & Engineering : C*, **25**(2), pp. 97-104.
- KOKUBO, T. and TAKADAMA, H., 2006. How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? *Biomaterials*, **27**(15), pp. 2907-2915.

- KORKUSUZ, P. and KORKUSUZ, F., 2004. Hard Tissue–Biomaterial Interactions . In: MICHAEL J. YASZEMSKI, DEBRA J. TRANTOLO, KAI-UWE LEWANDROWSKI, VASIF HASIRCI, DAVID E. ALTOBELLI, DONALD L. WISE, ed, *Biomaterials in Orthopedics*. New York: Marcel Dekker, Inc, pp. 1-40.
- KORVENTAUSTA, J., JOKINEN, M., ROSLING, A., PELTOLA, T. and YLI-URPO, A., 2003. Calcium phosphate formation and ion dissolution rates in silica gel-PDLLA composites. *Biomaterials*, **24**(28), pp. 5173-5182.
- KOTELA, I., PODPORSKA, J., SOLTYSIAK, E., KONSZTOWICZ, K.J. and BLAZEWICZ, M., 2009. Polymer nanocomposites for bone tissue substitutes. *Ceramics International*, **35**(6), pp. 2475-2480.
- LAI, W., GARINO, J. and DUCHEYNE, P., 2002. Silicon excretion from bioactive glass implanted in rabbit bone. *Biomaterials*, **23**(1), pp. 213-217.
- LEBOURG, M., SABATER SERRA, R., MÁ S ESTELLÉS, J., HERNÁNDEZ SÁNCHEZ, F., GÓMEZ RIBELLES, J.L. and SUAY ANTÓN, J., 2008a. Biodegradable polycaprolactone scaffold with controlled porosity obtained by modified particle-leaching technique. *Journal of materials science. Materials in medicine*, **19**(5), pp. 2047-2053.
- LEBOURG, M., SUAY ANTÓN, J. and GÓMEZ RIBELLES, J.L., 2010a. Characterization of calcium phosphate layers grown on polycaprolactone for tissue engineering purposes. *Composites Science and Technology*, **70**(13), pp. 1796-1804.
- LEBOURG, M., SUAY ANTÓN, J. and GÓMEZ RIBELLES, J.L., 2010b. Hybrid structure in PCL-HAp scaffold resulting from biomimetic apatite growth. *Journal of materials science. Materials in medicine*, **21**(1), pp. 33-44.
- LEBOURG, M., SUAY ANTÓN, J. and GÓMEZ RIBELLES, J.L., 2008b. Porous membranes of PLLA–PCL blend for tissue engineering applications. *European Polymer Journal*, **44**(7), pp. 2207-2218.
- LEE, E.H. and RADOK, J.R.M., 1960. The contact problem for viscoelastic bodies. *Journal of Applied Mechanics*, **27**(3), pp. 438-444.
- LEE, E., SHIN, D., KIM, H., KIM, H., KOH, Y. and JANG, J., 2009. Membrane of hybrid chitosan–silica xerogel for guided bone regeneration. *Biomaterials*, **30**(5), pp. 743-750.
- LEE, E., TENG, S., JANG, T., WANG, P., YOOK, S., KIM, H. and KOH, Y., 2010. Nanostructured poly( $\epsilon$ -caprolactone)–silica xerogel fibrous membrane for guided bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, **6**(9), pp. 3557-3565.
- LEE, S., YUN, H. and KIM, S., 2011. The comparative effects of mesoporous silica nanoparticles and colloidal silica on inflammation and apoptosis. *Biomaterials*, **32**(35), pp. 9434-9443.
- LEMONS, J., 1996. Properties of materials. In: B. RATNER, A. HOFFMAN, F. SCHOEN and J. LEMONS, eds, *Biomaterials Science, An Introduction to Materials in Medicine*. 2nd Edition edn. Estados Unidos: Elsevier Academic Press Inc, pp. 11-36.

- LIAO, Y.H., JONES, S.A., FORBES, B., MARTIN, G.P. and BROWN, M.B., 2005. Hyaluronan: Pharmaceutical Characterization and Drug Delivery. *Drug Delivery*, **12**(6), pp. 327-342.
- LIN, D., DON, T., CHEN, C., LIN, B., LEE, C. and CHENG, L., 2008. Preparation of a Nanosilica-Modified Negative-Type Acrylate Photoresist. *Journal of Applied Polymer Science*, **107**(2), pp. 1179-1188.
- LIN, D., CHEN, C., CHANG, C., SU, Y. and CHENG, L., 2002. Observation of Nano-Particles in Silica/poly(HEMA) Hybrid by Electron Microscopy. *Journal of Polymer Research*, **9**(2), pp. 115-118.
- LIU, W., ZHU, B., ZHANG, J. and XU, Y., 2007. Preparation and dielectric properties of polyimide/silica nanocomposite films prepared from sol-gel and blending process. *Polymers for Advanced Technologies*, **18**(7), pp. 522-528.
- LIU, Y., LIU, T., CHEN, S. and LIU, D., 2008. Synthesis and characterization of nanoporous SiO<sub>2</sub>/pHEMA biocomposites. *Journal of materials science: Materials in medicine*, **19**(8), pp. 2903-2911.
- LU, H., WANG, B., MA, J., HUANG, G. and VISWANATHAN, H., 2003. Measurement of Creep Compliance of Solid Polymers by Nanoindentation. *Mechanics of Time-Dependent Materials*, **7**(3-4), pp. 189-207.
- LU, L., ZHANG, Q., WOOTTON, D., CHIOU, R., LI, D., LU, B., LELKES, P. and ZHOU, J., 2012. Biocompatibility and biodegradation studies of PCL/β-TCP bone tissue scaffold fabricated by structural porogen method. *Journal of materials science: Materials in medicine*, **23**(9), pp. 2217-2226.
- LUCKACHAN, G.E. and PILLAI, C. K. S., 2011. Biodegradable Polymers- A Review on Recent Trends and Emerging Perspectives. *Journal of Polymers and the Environment*, **19**(3), pp. 637-676.
- MAHONY, O., TSIGKOU, O., IONESCU, C., MINELLI, C., LING, L., HANLY, R., SMITH, M.E., STEVENS, M.M. and JONES, J.R., 2010. Silica-Gelatin Hybrids with Tailorable Degradation and Mechanical Properties for Tissue Regeneration. *Advanced Functional Materials*, **20**(22), pp. 3835-3845.
- MAK, A.F., LAI, W.M. and MOW, V.C., 1987. Biphasic indentation of articular cartilage I. Theoretical analysis. *Journal of Biomechanics*, **20**(7), pp. 703-714.
- MANO J.F., SILVA G.A., AZEVEDO H.S., MALAFAYA P.B., SOUSA R.A., SILVA S.S., BOESEL L.F., OLIVEIRA J.M., SANTOS T.C., MARQUES A.P., NEVES N.M. and REIS R.L., 2007. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *Journal of the Royal Society, Interface*, **4**(17), pp. 999-1030.
- MATA, A., KIM, E.J., BOEHM, C.A., FLEISCHMAN, A.J., MUSCHLER, G.F. and ROY, S., 2009. A three-dimensional scaffold with precise micro-architecture and surface micro-textures. *Biomaterials*, **30**(27), pp. 4610-4617.

- MCNAUGHT, A.D. and WILKINSON, A., 2014-02-24; 2007-last update, IUPAC. Compendium of Chemical Terminology corrected version: created by ; updates compiled [Homepage of Blackwell Scientific Publications], [Online] [Marzo 09 de 2014, 2014].
- MEYERS, M.A., CHEN, P., LIN, A., YU-MIN, A. and SEKI, Y., 2008. Biological materials: Structure and mechanical properties. *Progress in Materials Science*, **53**(1), pp. 1-206.
- MIESZAWSKA, A.J., FOURLIGAS, N., GEORGAKOUDI, I., OUHIB, N.M., BELTON, D.J., PERRY, C.C. and KAPLAN, D.L., 2010. Osteoinductive silk-silica composite biomaterials for bone regeneration. *Biomaterials*, **31**(34), pp. 8902-8910.
- MONLEÓN PRADAS, M., GÓMEZ RIBELLES, J.L., SERRANO AROCA, A., GALLEGO FERRER, G., SUAY ANTON, J. and PISSIS, P., 2001a. Interaction between water and polymer chains in poly(hydroxy ethylacrylate) hydrogels. *Colloid Polymer Science*, **279**(4), pp. 323-330.
- MONLEÓN PRADAS, M., GÓMEZ RIBELLES, J.L., SERRANO AROCA, A., GALLEGO FERRER, G., SUAY ANTÓN, J. and PISSIS, P., 2001b. Porous poly(2-hydroxyethyl acrylate) hydrogels. *Polymer*, **42**(10), pp. 4667-4674.
- MOUSSAIF, N., CRESPO, C., MEIER, J.G. and JIMENEZ, M.A., 2012. Synergistic reinforcement of nanoclay and mesoporous silicate fillers in polycaprolactone: The effect of nanoclay on the compatibility of the components. *Polymer*, **53**(17), pp. 3741-3748.
- MÜLLER, L., CONFORTO, E., CAILLARD, D. and MÜLLER, F.A., 2007. Biomimetic apatite coatings-carbonate substitution and preferred growth orientation. *Biomolecular Engineering*, **24**(5), pp. 462-466.
- MUN, G.A., KHUTORYANSKIY, V.V., AKHMETKALIEVA, G.T., SHMAKOV, S.N., DUBOLAZOV, A.V., NURKEEVA, Z.S. and PARK, K., 2004. Interpolymer complexes of poly(acrylic acid) with poly(2-hydroxy ethyl acrylate) in aqueous solution. *Colloid Polymer Sciences*, **283**(2), pp. 174-181.
- MUSGO, J., ECHEVERRÍA, J.C., JUNCAL, E., LAGUNA, M. and GARRIDO, J.J., 2009. Ammonia-catalyzed silica xerogels: Simultaneous effects of pH, synthesis temperature, and ethanol:TEOS and water:TEOS molar ratios on textural and structural properties. *Microporous and mesoporous materials*, **118**(1-3), pp. 280-287.
- OLIVEIRA, A.L., MANO, J.F. and REIS, R.L., 2003. Nature-inspired calcium phosphate coatings: present status and novel advances in the science of mimicry. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, **7**(4), pp. 309-318.
- OYANE, A., MINODA, M., MIYAMOTO, T., TAKAHASHI, R., NAKANISHI, K., KIM, H.M. and KOKUBO, T., 1999. Apatite formation on ethylene-vinyl alcohol copolymer modified with silanol groups. *Journal of Biomedical Material Research*, **47**(3), pp. 367-373.
- PAL, K., BANTHIA, A.K. and MAJUMDAR, D.K., 2009. Polymeric hydrogel: Characterization and Biomedical Applications : A mini review. *Designed Monomers and Polymers*, **12**(3), pp. 197-220.

- PANDIS, C., SPANOUDAKI, A., KYRITSIS, A., PISSIS, P., RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ, J.C., GÓMEZ RIBELLES, J.L. and MONLEÓN PRADAS, M., 2011. Water sorption characteristics of poly(2-hydroxyethyl acrylate)/silica nanocomposite hydrogels. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, **49**(9), pp. 657-668.
- PARK, S.K., KIM, K.D. and KIM, H.T., 2002. Preparation of silica nanoparticles: determination of the optimal synthesis conditions for small and uniform particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **197**(1), pp. 7-17.
- PEREIRA, M., JONES, J., OREFICE, L. and HENCH, L., 2005. Preparation of bioactive glass-polyvinyl alcohol hybrid foams by sol-gel method. *Journal of material science: Material science in medicine*, **16**(11), pp. 1045-1050.
- PHADUNGSUKANAN, W., SHEKAR, S., SHIRLEY, R., SANDER, M., WEST, R.H. and KRAFT, M., 2009. First-Principles Thermochemistry for Silicon Species in the Decomposition of Tetraethoxysilane. *J. Phys. Chem A*, **113**(31), pp. 9041-9049.
- PIETAK, A.M., REID, J.W., STOTT, M.J. and SAYER, M., 2007. Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials*, **28**(28), pp. 4023-4032.
- PLAZAS BONILLA, C.E., GÓMEZ-TEJEDOR, J.A., PERILLA, J.E. and GÓMEZ RIBELLES, J.L., 2013. Silica phase formed by sol-gel reaction in the nano- and micro-pores of a polymer hydrogel. *Journal of Non-Crystalline Solids*, **379**, pp. 12-20.
- PLAZAS BONILLA, C. E., TRUJILLO, S., DEMIRDÖGEN, B., PERILLA, J. E., ELCIN, Y. M., GÓMEZ RIBELLES, J. L., 2014. New porous polycaprolactone-silica composites for bone regeneration. *Mater. Sci. Eng. C, In Progress*, **40**, pp. 418-426.
- POK, S.W., WALLACE, K.N. and MADIHALLY, S.V., 2010. In vitro characterization of polycaprolactone matrices generated in aqueous media. *Acta Biomaterialia*, **6**(3), pp. 1061-1068.
- POOLOGASUNDARAMPILLAI, G., IONESCU, C., TSIGKOU, O., MURUGESAN, M., HILL, R.G., STEVENS, M., HANNA, J.V., SMITH, M.E. and JONES, J.R., 2010. Synthesis of bioactive class II poly( $\gamma$ -glutamic acid)/silica hybrids for bone regeneration. *Journal of Materials Chemistry*, **20**(40), pp. 8952- 8961.
- PRAJAPATI, V., MAHERIYA, P., JANI, G. and SOLANKI, H., 2014. Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydrate Polymers*, **105**, pp. 97-112.
- PRICE, C.T., KOVAL, K.J. and LANGFORD, J.R., 2013. Silicon: A Review of Its Potential Role in the Prevention and Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. *International Journal of Endocrinology*, Journal doi: 10.1155/2013/316783.
- PUPPI, D., CHIellini, F., PIRAS, A.M. and CHIellini, E., 2010. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science*, **35**(4), pp. 403-440.
- QIN, J., ZHAO, H., LIU, X., ZHANG, X. and GU, Y., 2007. Double phase separation in preparing polyimide/silica hybrid films by sol gel method. *Polymer*, **48**(12), pp. 3379-3383.



- RAHMAN, I.A., VEJAYAKUMARAN, P., SIPAUT, C.S., ISMAIL, J., ABU BAKAR, M., ADNAN, R. and CHEE, C.K., 2006. Effect of anion electrolytes on the formation of silica nanoparticles via the sol-gel process. *Ceramics International*, **32**(6), pp. 691-699.
- RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S., SCHOEN, F.J. and LEMONS, J.E., 2012. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Tercera edn.
- REFFITT, D.M., OGSTON, N., JUGDAOHSINGH, R., CHEUNG, H.F.J., EVANS, B.A.J., THOMPSON, R.P.H., POWELL, J.J. and HAMPSON, G.N., 2003. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone*, **32**(2), pp. 127-135.
- REIS, E.M., VASCONCELOS, W.L., MANSUR, H.S. and PEREIRA, M.M., 2008. Synthesis and characterization of silica-chitosan porous hybrids for Tissue Engineering. *Key Engineering Materials*, **361-363**, pp. 967-970.
- REZAEI, A. and MOHAMMADI, M.R., 2012. Development of Hydroxyapatite Nanorods-Polycaprolactone Design of complex polymeric architectures and nanostructured materials/hybrids by living radical polymerization of hydroxylated monomer and Scaffolds Derived from a Novel In-Situ Sol-Gel Process. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **9**(6), pp. 295-303.
- REZAEI, A. and MOHAMMADI, M.R., 2013. In vitro study of hydroxyapatite/polycaprolactone (HA/PCL) nanocomposite synthesized by an in situ sol-gel process. *Materials Science and Engineering: C*, **33**(1), pp. 390-396.
- REZWAN, K., CHEN, Q.Z., BLAKER, J.J. and BOCCACCINI, A.R., 2006. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, **27**(18), pp. 3413-3431.
- RIM, J.E., ZAVATTIERI, P., JUSTER, A. and ESPINOSA, H.D., 2011. Dimensional analysis and parametric studies for designing artificial nacre. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **4**(2), pp. 190-211.
- RIMER, J., TROFYMLUK, O., NAVROTSKY, A., LOBO, R. and VLACHOS, D., 2007. Kinetic and Thermodynamic Studies of Silica Nanoparticle Dissolution. *Chemistry of Materials*, **19**(17), pp. 4189-4197.
- RIZZI, S.C., HEATH, D.J., COOMBES, A.G.A., BOCK, N., TEXTOR, M. and DOWNES, S., 2001. Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: Surface analysis and initial attachment of human osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research*, **55**(4), pp. 475-486.
- RÓDENAS-ROCHINA, J., GÓMEZ RIBELLES, J.L. and LEBOURG, M., 2013. Comparative study of PCL-HAp and PCL-bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **24**(5), pp. 1293-1308.
- RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ, J.C., MONLEÓN PRADAS, M. and GÓMEZ RIBELLES, J.L., 2008a. Properties of poly(2-hydroxyethyl acrylate)-silica nanocomposites obtained by sol-gel process. *Journal of Non-Crystalline Solids*, **354**(17), pp. 1900-1908.

RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ, J.C., SALMERÓN SÁNCHEZ, M., GÓMEZ RIBELLES, J.L. and MONLEÓN PRADAS, M., 2007. Polymer-silica nanocomposites prepared by sol-gel technique: Nanoindentation and tapping mode AFM studies. *European Polymer Journal*, **43**(7), pp. 2775-2783.

RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ, J.C., SERRANO AROCA, Á., GÓMEZ RIBELLES, J.L. and MONLEÓN PRADAS, M., 2008b. Three-dimensional nanocomposite scaffolds with ordered cylindrical orthogonal pores. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **84B**(2), pp. 541-549.

SALMERÓN SÁNCHEZ, M., BRÍGIDO DIEGO, R., IANNAZZO, S.A.M., GÓMEZ RIBELLES, J.L. and MONLEÓN PRADAS, M., 2004. The structure of poly(ethyl acrylate-co-hydroxyethyl methacrylate) copolymer networks by segmental dynamics studies based on structural relaxation experiments. *Polymer*, **45**(7), pp. 2349-2355.

SALMERÓN SÁNCHEZ, M., MONLEÓN PRADAS, M. and GÓMEZ RIBELLES, J.L., 2004. Thermal transitions in PHEA hydrogels by thermomechanical analysis. A comparison with DSC data. *European Polymer Journal*, **40**(2), pp. 329-334.

SERRANO AROCA, A., CAMPILLO FERNÁNDEZ, A., GÓMEZ RIBELLES, J.L., MONLEÓN PRADAS, M., GALLEGO FERRER, G. and PISSIS, P., 2004. Porous poly(2-hydroxyethyl acrylate) hydrogels prepared by radical polymerisation with methanol as diluent. *Polymer*, **45**(26), pp. 8949-8955.

SERRANO AROCA, A., MONLEÓN PRADAS, M. and GÓMEZ RIBELLES, J.L., 2007. Macroporous poly(methyl methacrylate) produced by phase separation during polymerisation in solution. *Colloid and Polymer Science*, **285**(7), pp. 753-760.

SEYEDNEJAD, H., GAWLITTA, D., KUIPER, R.V., DE BRUIN, A., VAN NOSTRUM, C.F., VERMONDEN, T., DHERT, W.J.A. and HENNINK, W.E., 2012. In vivo biocompatibility and biodegradation of 3D-printed porous scaffolds based on a hydroxyl-functionalized poly( $\epsilon$ -caprolactone). *Biomaterials*, **33**(17), pp. 4309-4318.

SHIN, K., KOH, Y., CHOI, W. and KIM, H., 2011. Production of porous poly ( $\epsilon$ -caprolactone) / silica hybrid membranes with patterned surface pores. *Materials Letters*, **65**(12), pp. 1903-1906.

SHOR, L., GÜÇERİ, S., WEN, X., GANDHI, M. and SUN, W., 2007. Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions *in vitro*. *Biomaterials*, **28**, pp. 5291-5297.

SIEGWART, D.J., OH, J.K. and MATYJASZEWSKI, K., 2012. ATRP in the design of functional materials for biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, **37**(1), pp. 18-37.

SIONKOWSKA, A., 2011. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. *Progress in Polymer Science*, **36**(9), pp. 1254-1276.

SIROUSAZAR, M., KOKABI, M. and HASSAN, Z.M., 2012. Swelling behavior and structural characteristics of Polyvinyl Alcohol/Montmorillonite nanocomposite hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science*, **123**(1), pp. 50-58.

STATHOPOULOS, A., KLONOS, P., KYRITSIS, P., PISSIS, P., CHRISTODOULIDES, C., RODRIGUEZ HERNÁNDEZ, J., MONLEÓN PRADAS, M. and GÓMEZ RIBELLES, J.L., 2010. Water sorption and polymer dynamics in hybrid poly(2-hydroxyethyl-co-ethyl acrylate)/silica hydrogels. *European Polymer Journal*, **46**(1), pp. 101-111.

STEGEMANN, J.P., KASZUBA, S.N. and ROWE, S.L., 2007. Review: Advances in vascular tissue engineering using protein-based biomaterials. *Tissue engineering*, **13**(11), pp. 2601-2613.

STÖBER, W., FINK, A. and BOHN, E., 1968. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science*, **26**(1), pp. 62-69.

SU, W., SHIH, Y. and KO, C., 2013. Effect of chitosan conduit under a dynamic culture on the proliferation and neural differentiation of human exfoliated deciduous teeth stem cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Journal doi: 10.1002/term.1783.

TAMURA, H., FURUIKE, T., NAIR, S.V. and JAYAKUMAR, R., 2011. Biomedical applications of chitin hydrogel membranes and scaffolds. *Carbohydrate Polymers*, **84**(2), pp. 820-824.

TRUJILLO, S. Materiales híbridos biodegradables policaprolactona-silice para la regeneración del hueso. 2012:1-73.

TRUJILLO, S., PLAZAS BONILLA, C.E., SANTOS, M.S., MATOS, J.M., GAMBOA, T., PERILLA, J.E., MANO, J.F., GÓMEZ RIBELLES, J.L., 2014. Polycaprolactone membranes reinforced by toughened sol-gel produced silica networks, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, Journal doi: 10.1007/s10971-014-3342-4.

VALLÉS LLUCH, A., 2008. *P(EMA co HEA) / SiO<sub>2</sub> hybrid nanocomposites for guided dentine tissue regeneration : Structure, characterization and bioactivity*, Universidad Politécnica de Valencia.

VALLÉS LLUCH, A., GALLEGO FERRER, G. and MONLEÓN PRADAS, M., 2010a. Effect of the silica content on the physico-chemical and relaxation properties of hybrid polymer/silica nanocomposites of P(EMA-co-HEA). *European Polymer Journal*, **46**(5), pp. 910-917.

VALLÉS LLUCH, A., GALLEGO FERRER, G. and MONLEÓN PRADAS, M., 2009. Surface modification of P(EMA-co-HEA)/SiO<sub>2</sub> nanohybrids for faster hydroxyapatite deposition in simulated body fluid? *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, **70**(2), pp. 218-225.

VALLÉS LLUCH, A., RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, J.C., GALLEGO FERRER, G. and MONLEÓN PRADAS, M., 2010b. Synthesis and characterization of poly(EMA-co-HEA)/SiO<sub>2</sub> nanohybrids. *European Polymer Journal*, **46**(7), pp. 1446-1455.

VALLÉS-LLUCH, A., NOVELLA-MAESTRE, E., SANCHO-TELLO, M., MONLEÓN PRADAS, M., GALLEGO FERRER, G. and CARDA BATALLA, C., 2010c. Mimicking natural dentin using bioactive nanohybrid scaffolds for dentinal tissue engineering. *Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society*, **16**(9), pp. 2783-2793.

VALLIANT, E.M. and JONES, J.R., 2011. Softening bioactive glass for bone regeneration: sol-gel hybrid materials. *Soft Matter*, **7**(11), pp. 5083-5095.

VARGÜN, E., 2003. *Polymerization and characterization of 2-hydroxyethyl acrylate*, The Middle East Technical University.

VICARIO, C., 2004. Los aloinjertos óseos en Cirugía Ortopédica y Traumatología. *Patología del Aparato Locomotor*, **2** (4):263-287.

VILLA, F., PÉREZ DEL POZO, M., MARTÍNEZ, C. and SORIANO, A., 2008. Reacción a un cuerpo extraño por agujas de Kirschner reabsorbibles en cirugía podológica. *Revista Internacional de Ciencias Podológicas*, **2**(1), pp. 39-46.

WEI, J., CHEN, F., SHIN, J., HONG, H., DAI, C., SU, J. and LIU, C., 2009. Preparation and characterization of bioactive mesoporous wollastonite – Polycaprolactone composite scaffold. *Biomaterials*, **30**(6), pp. 1080-1088.

WILLIAMS, D.F., ed, 1987. *Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986*. Amsterdam: Elsevier.

WILLIAMS, J.M., ADEWUNMI, A., SCHEK, R.M., FLANAGAN, C.L., KREBSBACH, P.H., FEINBERG, S.E., HOLLISTER, S.J. and DAS, S., 2005. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials*, **26**(23), pp. 4817-4827.

WONG, W. and MOONEY, D.J., 1997. Synthesis and Properties of Biodegradable Polymers Used as Synthetic Matrices for Tissue Engineering. In: A. ATALA and D.J. MOONEY, eds, *Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds*. Birkhäuser Boston: pp. 51-82.

WOODRUFF, M.A. and HUTMACHER, W.D., 2010. The return of a forgotten polymer— Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, **35**(10), pp. 1217-1256.

YAN, W., SHI, L., YUAN, S., ZHAO, Y., FANG, J. and ZHAO, J., 2010. Single-step synthesis of nanoporous silica colloids. *Materials Letters*, **64**(10), pp. 1208-1210.

ZOU, H., WU, S. and SHEN, J., 2008. Polymer/Silica Nanocomposites: Preparation , Characterization, Properties and Applications. *Chemical Reviews*, **108**(9), pp. 3893-3957.