

## **4 Conclusiones**

## 4.1 Conclusiones particulares

Se analizarán por separado, las conclusiones para cada familia de polímeros estudiadas en este trabajo.

### 4.1.1 Nylons 1,n

1. Se han sintetizado una serie de nylons 1,n a partir del método de condensación de formaldehído con dinitrilos. La temperatura y el tiempo de polimerización se han optimizado, considerando el peso molecular y la regularidad estructural del polímero obtenido. El tiempo de polimerización óptimo varía desde 0.5 hasta 3 horas, aumentando al incrementarse el número de metilenos del dinitrilo empleado. Por otro lado, los polímeros presentan un mayor grado de ramificación al aumentar la temperatura.

2. La conformación de la cadena de los nylons 1,n es diferente de la de las formas  $\alpha$  y  $\gamma$  convencionales, observándose un acortamiento de la longitud de la unidad repetitiva con respecto a ambas estructuras.

3. El grupo metileno aislado, situado entre los dos grupos amida, tiene una fuerte preferencia conformacional. Como consecuencia, los dos grupos amida vecinos están orientados en direcciones opuestas.

4. Se han encontrado diferentes conformaciones dependiendo del número de grupos metileno en la unidad repetitiva. Estas diferencias pueden interpretarse como consecuencia de cambios conformacionales en el segmento carbonílico dependiendo de la paridad del número de grupos metileno.

5. Cuando  $n$  es par el empaquetamiento de las cadenas es monoclinico y la estructura está definida por un grupo espacial B 2/b11. Hay una única dirección de puentes de hidrógeno y el plano de plegamiento coincide con el plano de los enlaces de hidrógeno.

6. Cuando  $n$  es impar y de valor bajo las cadenas moleculares están empaquetadas de forma hexagonal. La estructura se define por un grupo espacial P 3<sub>2</sub>12 ó P 3<sub>1</sub>12, dependiendo del sentido de giro de la hélice. En este caso hay tres direcciones de puentes de hidrógeno y cada hélice está unida a sus seis vecinas por enlaces de hidrógeno.

7. En todos los casos las cadenas moleculares están plegadas dentro de la lamela. En el nylon 1,10 el plegamiento tiene lugar a lo largo de las láminas unidas por puentes de hidrógeno, y probablemente también en el resto de nylons 1,n con n par.

8. La conformación particular de los nylons 1,n proporciona a los mismos una estabilidad estructural mayor (puntos de fusión más elevados) que la propia de los nylons convencionales. Por otra parte, su estabilidad química es comparativamente menor, ya que su descomposición comienza alrededor de 230 °C.

### 4.1.2 Copolímeros de glicina y $\omega$ -aminoácidos

1. Los nylons resultantes de la copolimerización de glicina con los ácidos 6-aminohexanoico y 12-aminododecanoico son de bajo peso molecular. Después de un tratamiento térmico, se consigue que los copolímeros 2/12 tengan un peso molecular suficiente para que sea posible su procesado en forma de fibras.

2. En los copolímeros 2/12 hay una mayor tendencia hacia la formación de bloques que en los copolímeros 2/6 y más especialmente en los nylons con alto contenido de glicina.

3. Todas las copoliámidas poseen una cristalinidad considerable, como se deduce de los estudios de difracción de rayos X y de análisis térmico. Los polímeros con una composición cercana a la del homopolímero son los más cristalinos.

4. La forma  $\alpha$  parece ser más favorable que la forma  $\gamma$  para acomodar las unidades de glicina en los nylons 2/12, tal como se deduce del análisis por difracción de rayos X.

5. Se han obtenido fibras, de alta cristalinidad y aceptables propiedades mecánicas, de los copolímeros 2/11 y 2/12 con una proporción de glicina del 10%.

### 4.1.3 Nylons 2/6/2,10 y 2/12/2,10

1. Los nylons 2/6/2,10 y 2/12/2,10 se han sintetizado por polimerización interfacial del dicloruro de ácido sebáico y una diamina derivada del acoplamiento de dos unidades de glicina a la hexametildiamina o a la dodecametildiamina respectivamente. El nylon 2/6/2,10 se obtuvo con un 45% de rendimiento y un peso molecular de alrededor de 8000, mientras que en el caso del nylon 2/12/2,10 el rendimiento fue del 94% y el peso molecular de 4000.

2. Ambos nylons poseen puntos de fusión elevados (261.5 °C el nylon 2/6/2,10 y 244.5 °C el nylon 2/12/2,10). Estos puntos de fusión son intermedios entre los correspondientes a las poliamidas tipo  $m,n$  (con  $m=n$  *par* y  $m=n$  *impar*) de similar densidad de grupos amida.

3. Los monocristales obtenidos de estos nylons son de morfologías alargadas, lo que indica una distribución asimétrica de los puentes de hidrógeno, y con bordes dentados, significativo de un crecimiento cristalino desordenado.

4. A partir de los datos de difracción de electrones y de difracción de rayos X se ha determinado para los nylons 2/6/2,10 y 2/12/2,10 una estructura hexagonal de parámetros  $a=b=4.79 \text{ \AA}$ ,  $\alpha=\beta=90^\circ$  y  $\gamma=120^\circ$ . El parámetro  $c$  es de  $80.7 \text{ \AA}$  para el caso del nylon 2/6/2,10 y de  $102.9 \text{ \AA}$  para el nylon 2/12/2,10.

5. Los residuos de glicina adoptan una conformación tipo poliglicina II, en la cual los grupos amida contiguos apuntan según direcciones giradas  $120^\circ$ . Esta conformación justifica el acortamiento característico (aproximadamente  $0.8 \text{ \AA}$  por grupo amida) de la longitud de la unidad repetitiva con respecto a las formas estiradas. La estructura más probable corresponde a un empaquetamiento hexagonal de hélices de simetría ternaria, enlazadas intermolecularmente mediante puentes de hidrógeno.

6. El espesor lamelar, observado en el nylon 2/6/2,10 corresponde a dos unidades repetitivas, y es por tanto menor que la unidad periódica. La asimetría esperada en la distribución de puentes de hidrógeno justifica las morfologías alargadas observadas en los monocristales obtenidos.

#### 4.1.4 Nylon 12,10

1. Se ha sintetizado el nylon 12,10, con un peso molecular alrededor de 8000, por polimerización interfacial del dicloruro de ácido sebácico y la dodecametilendiamina. El polímero se ha caracterizado por las técnicas fisicoquímicas y estructurales habituales.

2. Se han obtenido cristales de morfología alargada con un grosor lamelar, determinado por difracción de rayos X a bajo ángulo, de  $68.3 \text{ \AA}$ .

3. A partir de los datos de difracción de rayos X y de difracción de electrones, se ha determinado para el nylon 12,10 una estructura cristalina triclínica de parámetros:

$$a = 4.91 \text{ \AA}, b = 8.17 \text{ \AA}, c = 28.39 \text{ \AA}$$

$$\alpha = 90^\circ, \beta = 79.38^\circ, \gamma = 67.22^\circ$$

4. Los datos estructurales obtenidos para el nylon 12,10 son compatibles con la estructura  $\beta$  clásica de los nylons.

#### **4.1.5 Nylons 2/6/2,10 y 2/12/2,10 con defecto de glicina**

1. Se han sintetizado dos series de nylons 2/6/2,10 y 2/12/2,10 con diferentes proporciones de glicina. Los nylons 2/12/2,10 se han obtenido con un rendimiento del 80% y una incorporación de glicina acorde con la esperada. El rendimiento, en el caso de la serie de nylons 2/6/2,10 ha sido menor, al igual que la incorporación de glicina.

2. Los nylons de la serie de polímeros 2/12/2,10 presentan una mayor estabilidad térmica que la correspondiente a los nylons 2/6/2,10.

3. La estructura de los polímeros 2/m/2,n con defecto de glicina se asemeja a la de los nylons m,n cuando el contenido de glicina es bajo, y a la de los nylons 2/m/2,n cuando la proporción de la misma es elevada.

4. Los polímeros se han procesado en forma de fibra. En el caso de los nylons derivados de la hexametildiamina los diagramas de difracción de rayos X de las mismas son muy pobres, mientras que los polímeros derivados de la dodecametilendiamina dan lugar a diagramas de difracción de rayos X con un mayor grado de orientación, debido a su mejor procesabilidad. En este sentido destaca el nylon 2/12/2,10 con una proporción de glicina del 37.4%, cuyo diagrama de difracción es comparable con el correspondiente al polímero secuencial, aunque se observan reflexiones adicionales, indicativas de un mayor estiramiento.

## 4.2 Conclusiones generales

1. Se han encontrado nuevas estructuras, diferentes de las convencionales, en nylons que poseen un único metileno aislado entre dos grupos amida. La conformación particular de esta unidad monometilénica es la que determina la nueva estructura, caracterizada por un acortamiento de la unidad repetitiva con respecto a las formas clásicas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de los nylons. Estas nuevas estructuras se hallan también caracterizadas por una distribución distintiva de puentes de hidrógeno, respecto a la unidireccional postulada para las estructuras convencionales.

2. Las unidades de monometilen-bis(amida) presentan una conformación singular, en la cual los grupos amida contiguos apuntan según direcciones opuestas. Esta conformación es característica de todos los nylons 1,n estudiados hasta el momento. Se han encontrado, sin embargo, diferencias conformacionales dependiendo de la paridad del número de grupos metileno en el segmento carbonílico. Las estructuras resultantes se caracterizan por la existencia de una o tres direcciones de puentes de hidrógeno.

3. La glicina adopta la conformación característica de la poliglicina II en sus copolímeros secuenciales con diaminas y ácidos dicarboxílicos. Esta conformación permite el establecimiento de una red tridireccional de puentes de hidrógeno, que debe influir notablemente en las características de los correspondientes polímeros.

4. La introducción de baja proporción de glicina en los nylons n y m,n, con elevado número de metilenos, da lugar a polímeros que pueden procesarse en forma de fibras. Estas fibras tienen aceptables propiedades mecánicas y buenas posibilidades como materiales biomédicos.

# **Bibliografía**

## Bibliografía

- Abe, Y. y Krimm, S., *Biopolymers*, **11**, 1817, (1972).
- Abu-Isa, I., *J. Polym. Sci. Part A-1*, **9**, 199, (1971).
- Aharoni, S.M., *J. Appl. Polym. Sci.*, **21**, 1323, (1977).
- Alemán, C. y Pérez, J.J., *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)*, **285**, 221, (1993a).
- Alemán, C. y Pérez, J.J., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **41**, 606, (1993b).
- Alemán, C. y Pérez, J.J., *Int. J. Quantum Chem.*, **47**, 231, (1993).
- Alemán, C. y Pérez, J.J., *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)*, in press (1994).
- Anderson, J.H., Gibbons, D.F., Martín, R.L., Hiltner, A., Wood, R., *J. Biomed. Mater. Res., Symp.*, **5**, 197, (1974).
- Arimoto, H., *J. Polym. Sci. Part A*, **2**, 2283, (1964).
- Arimoto, H., Ishibashi, M., Hirai, M. y Chatani, Y., *J. Polym. Sci., Part A*, **3**, 317, (1965).
- Arnott, S. y Dover, S.D., *J. Mol. Biol.*, **30**, 209, (1967).
- Arnott, S., Dover, S.D. y Elliott, A., *J. Mol. Biol.*, **30**, 201, (1967).
- Atkins, E.D.T., Hill, M., Hong, S.K., Keller, A. y Organ, S., *Macromolecules*, **25**, 917, (1991).
- Baer, M., *J. Polym. Sci.*, **A2**, 417, (1964).
- Bailey, W.J., Okamoto, Y., Kuo, W.C. y Narita, T., *Proc. Int. Biodegradation Symp.*, 3rd, 765, Edited by Sharpley, Miles, J., Kaplan, Arthur M. *Appl. Sci.* (1976).
- Bailey, W.J., In *Proc. 6th Int. Symp. on the Stabilization and Controlled Degradation of Polymers*, Lucerne-Switzerland, (1984).
- Bailey, W.J. y Gapud, B., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **446**, 42, (1985).

- Bella, J., Puiggali, J. y Subirana, J.A., *Peptides*, 452, (1990).
- Bella, J. y Subirana, J.A., *Polymer Preprints*, 1, 33, (1990).
- Bella, J., *Butll. Soc. Cat. Cien.* 12 (2), 515, (1991a).
- Bella, J., "Estructura cristalina de poliamidas y poliésteres", Tesis doctoral, (1991b).
- Bella, J., Puiggali, J. y Subirana, J.A., *Polymers*, 35, nº 6, 1291, (1994).
- Bellinger, M.A., Waddon, A.J., Atkins, E.D.T. y MacKnight, W.J., *Macromolecules*, 27, 2130, (1994).
- Bergmann, M. y Zervas, L., *Ber.*, 65, 1192, (1932).
- Bergmann, M., Zervas, L., Ross, W.F., *J. Biol. Chem.*, 111, 245, (1935).
- Bermúdez, M., Puiggali, J. y Muñoz-Guerra, J.A., *Macromolecules*, in press(1994).
- Bodanzski, M y Bodanzski, A., "*The Practice of Peptide Synthesis*". Springer-Verlag, (1984).
- Bradbury, E.M., Brown, L., Downie, A.R., Elliot, A., Fraser, R.D.B. y Hanby, W.E., *J. Mol. Biol.*, 5, 230, (1962).
- Brandrup, J. y Immergut, E.H., "*Polymer Handbook*", 3ª edición. John Wiley and Sons, (1988).
- Bunn, C. W. y Garner, E. V., *Proc. Roy. Soc. Lond.*, A189, 39, (1947).
- Campbell-Smith, P.J. y Arnott S., *Acta Cryst.*, A34, 3, (1978).
- Champetier, G., Monnerie, L., "Introduction à la chimie macromoléculaire", Masson et cie. editeurs, París, (1969).
- Clark, E.S. y Wilson, F.C., Physical Structure of Nylons. En "Nylon Plastics" (M.I. Kohan, ed.) John Wiley and Sons, New York, pags. 271-305, (1973).
- Coffman, D.D., Berchet, G.J., Peterson, U.R., Spanagel, E.W., *J. Polym. Sci.*, 2, 306, (1947).
- Cogolewski, S., Czerniawska, K., Gastiorek, M., *Colloid & Polymer Sci.*, 258, 1130, (1980).
- Cojazzi, G., Fichera, A., Malta, V., Zannetti, R., *Makromol. Chem.*, 179, 509, (1973a).

- Cojazzi, G., Fichera, A., Garbuglio, C., Malta, V., Zannetti, R., *Makromol. Chem.*, **168**, 289, (1973b).
- Colonna-Cesari, F., Premilat, S., Heith, F., Spach, G. y Lotz, B., *Macromolecules*, **10**, 1284, (1977).
- Crick, F.H.C. y Rich, A., *Nature* (London), **176**, 780, (1955).
- Doty, P., Bradbury, J.H. y Holtzer, A.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3955, (1956).
- Doyle, P.A. y Cowley, J.M., "International Tables for X-Ray Crystallography. Vol. IV: Revised and Supplementary Tables to Volumes II y III" (J.A. Ibers y W.C. Hamilton, eds.), Kynoch Press, Birmingham, England, pags. 152-175, (1974).
- Dreyfuss, P., *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.*, **11**, 201, (1973).
- Dreyfuss, P. y Keller, A., *J. Polym. Sci. Phys. Ed.*, **11**, 193, (1973).
- Edman, P., *Acta. Chem. Scand.* **10**, 761, (1956).
- Elias, H.G. y Schumacher, R., *Makromol. Chem.*, **76**, 23, (1964).
- El Masdouri *et al.* , *J. Chim. Phys.*, **85**, 583, (1988).
- El-Masdouri L., Aubry A., Gómez, E., Vitoux, B. y Marraud, M., *Acta Cryst.* **C48**, 176, (1992).
- Fasman, G.D., "Poly- $\alpha$ -aminoacids", Marcel Dekker Inc., New York, (1967).
- Fernández-Santín, J.M., "Estructura Cristalina de Poliamidas". Tesis Doctoral, (1986).
- Fernández-Santín, J.M., Muñoz-Guerra, S., Rodríguez-Galán, A., Aymamí, J., Lloveras, J., Subirana, J.A., Giralt, E. y Ptak, M., *Macromolecules*, **20**, 62, (1987).
- Flory, P.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 2857, (1962).
- Fraser, R.D.B. y Mac Rae, T.P., "Conformation in Fibrous Proteins and Related Synthetic Polypeptides", Academic Press, New York, (1973).
- Frazza, E.J. y Schmitt, E.E., *J. Biomed. Mater. Res. Symp.*, **1**, 43, (1970).
- Fredericks, R.J., Doyne, T.H. y Sprague, R.S., *J. Polym. Sci., Part. A-2*, **4**, 913, (1966).
- Garmon, R.G. y Gibson, M.E., *Anal. Chem.*, **37**(1), 1309, (1965).

- Gonsalves, K.E. y Chen X., *Polym. Communications*, **31**, 312, (1990).
- Gonsalves, K.E., Chen X., Wong, T.K., *J. Mater. Chem.*, **1**(4), 643, (1991).
- Hasegawa, R.K., Kimoto, K., Chatani, Y., Tadokoro, H. y Sekiguchi, H., *Disc. Meeting Soc. Polym. Sci., JPN., Tokyo, Preprints P.*, 713, (1974).
- Hayash, Y., Takamoto, A., Kawahara, K. y Fujima, A., *Biopolymers*, **8**, 403, (1969).
- Haslam, J., Willis, H.A., Squirrell, D.C., "Identification and analysis of plastics", 2nd edition, 643, (1972).
- Heikens, D., Hermans, P.H., *J. Polym., Sci.*, **44**, 429, (1960).
- Heitz, F., Lotz, B. y Spach, G., *J. Mol. Biol.*, **92**, 1, (1975).
- Holmes, D.R., Bunn, C.W. y Smith, D.J., *J. Polym. Sci.*, **17**, 159, (1955).
- Homsy, C. A., *J. Biomed. Mater. Res.*, **4**, 341, (1970).
- Ishikawa, T., Nagai, S., *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.*, **15**, 1315, (1977).
- Ishikawa, T., Nagai, S. y Kasai, N., *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.*, **18**, 291, (1980).
- Janssen, P.S.L., Van Nispen, J.W., Melgers, P.A.T.A., Van den Bogaart, H.W.M., Hamelinck, R.L.A.E. y Goverde, B.C., *Chromatographia*, **22**, nº 7-12, 345, (1986).
- Kaplan, A.M., *1st Intersectional Congress of the International Assoc. of Microbiological Soc., Preprints*, Tokyo, Japan, Sept. 1-7, (1974).
- Kappor, A., Davis, E.J., Graetzer, M.J., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **57** (9), 1514, (1960).
- Kawaguchi, A., Ikawa, T., Fujiwara, Y., Tabuchi, M. y Monobe, K., *J. Macromol. Sci. Phys.*, **B 20**(1), 1, (1981).
- Keller, A., *Phil. Mag*, [8], **2**, 1171, (1957).
- Keller, A., *J. Polym. Sci.*, **39**, 151, (1959).
- Kinoshita, Y., *Makromol. Chem.*, **33**, 1, (1959a).
- Kinoshita, Y., *Makromol. Chem.*, **33**, 21, (1959b).

- Kohan, M.I., "Nylon Plastics", ed. M.I. Kohan, pag 13. Wiley Interscience. New York (1973).
- Kovacs, J., Ballina, R., Rodin, R.L., Balasubramanian, D. y Applequist, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 119, (1966).
- Kupryszewski, G., *Rocz. Chem.*, **35**, 1533, (1961).
- Kurata, M., Tsunashima, Y., Iwawa, M. y Kamada, K., Polymer Handbook 2nd Ed. (Brandrup, K., Immergut, E.H. y Mc Dowell, W., eds), Wiley Interscience, New York, (1975).
- Longbottom, R.W., *Mod. Text.*, **49** (12), 19, (1968).
- Lotz, B. y Keith, H.D., *J. Mol. Biol.*, **61**, 195, (1971).
- Lotz, B., *J. Mol. Biol.*, **87**, 169, (1974).
- Lotz, B., Colonna-Cesari, F., Heitz, F. y Spach, G., *J. Mol. Biol.*, **106**, 915, (1976).
- Lotz, B. y Brack, A., "Applied Fibre Science", (F. Happey, ed.), Vol. 3, Academic Press, London, Pag. 371-410, (1979).
- Lotz, B. y Wittmann, J.C., *J. Microsc. Spectrosc. Electron.*, **10**, 209, (1985).
- Magat, E.E., Chandler, L.B., Faris, B.F., Reith, J.E. y Salisbury, L.F., *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 1031, (1951).
- Marchant, R.E, Anderson, J.M., Castillo, E. y Hiltner, A., *J. Biomed. Mater. Res*, **20**, 153, (1986).
- Michel, D., Tesis doctoral, INSERM-306, Université de Bordeaux II, (1988).
- Miller, G.W., *Appl. Polym. Symp.*, **10**, 35, (1969).
- Miller, R.L., "Polymer Handbook", 3rd ed., Chapter VI, J. Brandrup and E.H. Immergut Eds., Wiley Interscience, New York, (1989).
- Montserrat, J.M., Muñoz-Guerra, S. y Subirana, J.A., *Makromol. Chem., Macromol. Symp.* **20/21**, 319, (1988).
- Moore, W.H. y Krimm, S., *Biopolymers*, **15**, 2439, (1976).
- Moss, B., Dorset, D.L., Wittmann, J.C. y Lotz, B., *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.*, **22**, 1919, (1984).

- Moss, B., Dorset, D.L., Wittmann, J.C. y Lotz, B., *J. Macromol. Sci. Phys.*, **B 24** (1-4), 99, (1985-1986).
- Mowry, J.T. y Ringwald, E.L., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 4439, (1950).
- Muñoz-Guerra, S., Fita, I., Aymamí, J. y Puiggali, J., *Macromolecules*, **21**, 3464, (1988).
- Nagata, M. y Kiyotsukuri, T. *Eur. Polym. J.*, **28(9)**, 1069, (1992).
- Organ, S., Keller, A., *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, **25**, 2409, (1987)
- Padden, F.J. y Keith, H.D., *J. Appl. Phys.*, **36**, 2987, (1965).
- Paiaro, G., Pandolfo, L., Busico, V. y Corradini, P., *Eur. Polym. J.*, **24**, 99, (1988).
- Patton, A.R. y Chism, P., *Anal. Chem.*, **23**, 1683, (1951).
- Pauling, L., Corey, R.B. y Branson, H.R., *Proc. Natl. Acad. Sci., (USA)*, **37**, 205, (1951).
- Pauling, L. y Corey, R.B., *Proc. Natl. Acad. Sci., (USA)*, **37**, 235, (1951a).
- Pauling, L. y Corey, R.B., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **37**, 251, (1951b).
- Pauling, L. y Corey, R.B., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **39**, 253, (1953).
- Potts, J.E., Clendinning, R.A., Ackart, W.B. y Niegisch, W.D., en *Polymers and Ecological Problems* (J. Guillet, ed.), Plenum Press, New York, pag. 61, (1973).
- Potts, J.E., Clendinning, R.A. y Ackart, W.B., *Abstracts of 9th Middle Atlantic Regional Meeting of Amer. Chem. Soc.*, Wilkes-Barres, Pa., April 26, pag. 72, (1974).
- Prieto, A., Perez, R. y Subirana, J.A., *J. Appl. Phys.*, **66**, 803, (1989).
- Prieto, A., Tesis Doctoral, (1991).
- Puiggali, J., Muñoz-Guerra, S. y Lotz, B., *Macromolecules*, **19**, 1119, (1986).
- Puiggali, J. y Muñoz-Guerra, S., *J. Polym. Sci., part B: Polym. Phys.*, **25**, 513, (1987a).
- Puiggali, J., Muñoz-Guerra, S. y Subirana, J.A., *J. Polym. Sci., part. A: Polym. Chem. Ed.*, **25**, 1445, (1987b).

- Puiggali, J., Muñoz-Guerra, S. y Subirana, J.A., *Polymer*, **28**, 209, (1987c).
- Puiggali, J., Muñoz-Guerra, S., Rodríguez-Galán, A., Alegre, C. y Subirana, J.A., *Makromol. Chem., Makromol Symp.*, **20/21**, 167, (1988).
- Puiggali, J. y Muñoz-Guerra, S., *J. Polym. Sci., part B: Polym. Phys.*, **27**, 1563, (1989).
- Puiggali, J., Aceituno, J.E., Franco, L., Lloveras, J., Prieto, A., Vidal, X., Xenopoulos, A., Fernández-Santín, J.M. y Subirana, J.A., *Prog. Colloid. & Polym. Sci.*, **87**, 35, (1992).
- Rabek, J.A., "Experimental Methods in Polymer Chemistry", John Wiley & Sons, pag 474, (1980).
- Radhakrishna, A.S., Darham, M.E., Riggs, R.M., Loundo, G.M., *J. Org. Chem.*, **10**, 1746, (1979).
- Ramachandran, G.N. y Kartha, G., *Nature (London)*, **176**, 593, (1955).
- Ramachandran, G.N., Ramakrishnan, C. y Venkatachalam, C.M., "Conformation of Biopolymers", 2, Ramachandran, G.N. ed., Academic Press, London, 429, (1967).
- Reindel, F. y Hope, W., *Chem. Ber.*, **87**, 1103, (1954).
- Rich, A. y Crick, F.H.C., *Nature (London)*, **76**, 915, (1955).
- Riddick, J.A. y Bunger, W.B., "Physical properties and methods of Purification", Organic Solvents, Wiley Interscience, John Wiley and sons, (1970).
- Ruderman, R.J., Bernstein, E., Kairinen, E. y Hegyeli, F., *J. Biomed. Mater. Res.*, **7**, 215, (1973).
- Sanger, F., *Biochem. J.*, **39**, 507, (1945).
- Schaeffgen, J.R. y Flory, P.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 2709, (1948).
- Schellmann, J.A. y Schellmann, C., "The protein", Neurath, H., ed., 2, Academic Press, New York, 1, (1964).
- Schnabel, E., *Annalen*, 702, 188, (1967).
- Schiltz, E., Schnackerz, K.D. y Gracy, R.W., *Anal. Biochem.*, **79**, 33, (1977).
- Shibner, V.A., Chureava, T.P., Poroshin, K.T., *Izr. Akad. Nauk. SSSR. Ser. Khim.*, **11**, 2527, (1969).

- Sorenson, W.R., Campbell, T.W., "Preparative Methods of Polymer Chemistry", Interscience, New York, (1961).
- Staudinger, H. y Heuer, W., *Ber.*, **63B**, 222, (1930).
- Stern, P.S., Chorev, M., Goodman, M. y Hagler, A.T., *Biopolymers*, **22**, 1885, (1983a).
- Stern, P.S., Chorev, M., Goodman, M. y Hagler, A.T., *Biopolymers*, **22**, 1901, (1983b).
- Subirana, J.A., *Revista de plásticos*, **65**, 15, (1960).
- Takeda, Y., Iitaka, Y. y Tsuboi, M., *J. Mol. Biol.*, **51**, 101, (1970).
- Tereshko, V., Navarro, E., Puiggali, J., Subirana, J.A., *Macromolecules*, **26**, 7024, (1993).
- Tormo, J., Puiggali, J., Vives, J., Fita, J., Lloveras, J., Bella, J., Aymamí, J. y Subirana, J.A., *Biopolymers*, **32**, 643, (1992).
- Van Krevelen, D.W., "Properties of polymers", 2nd. edn. Elsevier, Amsterdam, (1976).
- Vogelsong, D.C., *J. Polym. Sci., A*, **1**, 1055, (1963).
- Walton, A.G., "Conformation of biological molecules and polymers". *The Jerusalem Symposium on quantum chemistry and biochemistry*, **5**, 189, (1973).
- Wieland Th., Schaffer, W., Bokelmann, E., *Annalen*, **573**, 99, (1951).
- Willians, D.F., *J. Mat. Sci.*, **22**, 3421, (1987).
- Wittmann, J.C., Hodge, A.M. y Lotz, B., *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.*, **21**, 2495, (1983).
- Wittmann, J.C. y Lotz, B., *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.*, **23**, 205, (1985).
- Wunderlich, B., *Macromolecular Physics*, Vol.1, Academic Press, (1973).
- Wunderlich, B., *Macromolecular Physics*, Vol. 3, Academic Press, (1980).
- Xenopoulos, A., Wunderlich, B. y Subirana, J.A., *Eur. Polym. J.*, **29(7)**, 927, (1993).
- Yang, J., Wang, M., Fambri, L., Ottenbrite, R., *Polymer Preprints*, **34**, 2, (1993).
- Ziabicki, A., *Kolloid Z*, **167**, 132, (1959).

**Anexo 1**  
**Biocompatibilidad y**  
**biodegradabilidad**

# 1 Biocompatibilidad y biodegradabilidad

Los estudios de biocompatibilidad y biodegradabilidad de las poliamidas caracterizadas en este trabajo han sido realizados por Cristina Peraire Sirera en CIDASAL, dentro del proyecto BRITE-EURAM, BE-3106-89.

## 1.1 Métodos de evaluación

Para evaluar la biocompatibilidad y biodegradabilidad de un polímero, se llevan a cabo ensayos "in vitro" y "in vivo".

En este trabajo se han realizado pruebas "in vitro" para conocer la **biocompatibilidad basal**, con el objetivo de detectar alteraciones en la membrana y en las funciones celulares como mitosis, respiratoria etc. Los ensayos realizados han sido: test de contacto directo, test de contacto indirecto con el líquido de extracción y test de contacto indirecto con agar difusión. Los resultados se valoran cualitativamente, según el criterio de Homsy *et al.* (1970), y cuantitativamente mediante las pruebas de:

- i. Rojo neutro. La alteración de la membrana lisosomal, por la citotoxicidad del material, provoca una disminución en la fijación del colorante. La cantidad del colorante es proporcional al número de células vivas.
- ii. MTT o azul de tiazolilo (3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil-2H-tetrazoliobromuro). Se considera un indicador del número y actividad metabólica de las células vivas.
- iii. LDH (lactato deshidrogenasa). La alteración de la membrana celular por un agente citotóxico produce la liberación de este enzima, que en condiciones normales se encuentra en el citosol celular.

En cuanto a métodos "in vivo" se han realizado implantaciones intramusculares y subcutáneas en "cage", en rata, a diferentes tiempos. Además, con las poliamidas que se pudieron procesar en forma de fibra, debido a sus buenas propiedades fisicoquímicas, se estudió la **biocompatibilidad específica**, valorando la producción de colágeno I y III de células fibroblásticas de piel humana en contacto con el biomaterial.

Todos los test realizados se han llevado a cabo según normas vigentes de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), American Society for Testing Materials (ASTM) o la Norma Francesa (NF). En la Tabla [1] se muestran algunos de los ensayos más importantes y la norma vigente según la cual se llevan a cabo.

Tabla [1]. Diferentes tipos de ensayos biológicos.

ENSAYO	TIPO DE TEST	EVALUACION	NORMA
In vitro	Contacto directo	Potencial citotóxico del material	ASTM F 813-83 NF S 90-702
In vitro	Contacto indirecto con el líquido de extracción	Citocompatibilidad	NF S90-701/702
In vitro	Contacto indirecto con agar difusión	Presencia de partículas tóxicas que difunden del material	ASTM F895
In vitro	Adherencia y proliferación celular	Capacidad como soporte de adhesión y proliferación celular	NF S91-142
In vivo	Implantación intramuscular en glúteo de rata	Reacción tisular	ASTM F638 USP XXII
In vivo	Implantación subcutánea de "cages" en rata	Biocompatibilidad y posible biodegradación	Marchant <i>et al.</i> (1986)

a) *Test de contacto directo.* Evalúa cualitativa y cuantitativamente el potencial citotóxico del material. Se utilizan tres controles de referencia: control blanco (células sin material), control negativo (polietileno USP plastic standard) y control positivo (goma latex). El material se pone en contacto con el cultivo celular semiconfluyente de fibroblastos L929 de ratón. Posteriormente se mantienen en incubación a 37 °C y 5.5% de CO<sub>2</sub> durante 24 y/o 48 horas, al cabo de las cuales se observa el estado de las células que circundan el material. Se consideran biocompatibles los materiales que presentan una reacción semejante a la del control negativo.

b) *Test de contacto indirecto.* Evalúa la citocompatibilidad de biomateriales mediante el contacto del líquido de extracción del material con células de una línea inmortal o procedente de cultivos primarios. Detecta la presencia de partículas tóxicas en el biomaterial evaluado. En primer lugar se realiza un control blanco que consiste en el vehículo de extracción sometido a las mismas condiciones, pero en ausencia de material. A continuación se preparan cuatro concentraciones del líquido de extracción en medio de cultivo completo (100%, 50%, 10% y 1%), y después de 24 horas de incubación se

recolecta el medio, para valorar la actividad LDH y realizar la tinción celular con Rojo Neutro y MTT.

c) *Test de Agar difusión.* Detecta la presencia de partículas tóxicas que difunden del material. Es independiente de la forma del biomaterial ensayado por lo que es muy adecuado para muestras en forma de polvo. Se colocan las muestras sobre el agar difusión que contiene el medio de cultivo, que a su vez está en contacto con la monocapa de células. Al cabo de 24 horas se observan los cultivos al microscopio óptico invertido. Se obtiene un índice de respuesta de cada material (índice de reacción), que viene expresado por la relación entre el índice de zona (zona donde las células no están teñidas) y el índice de lisis (número de células afectadas dentro de la zona de citotoxicidad).

d) *Test de adherencia y proliferación celular.* Valora la capacidad que tienen los biomateriales como soporte de adhesión y proliferación de cualquier tipo celular procedente de una línea inmortal o de un cultivo primario. La adherencia celular se observa al cabo de 1, 3, 6 y 24 horas y la proliferación se evalúa a 3, 6, 9, 12, 15 y 18 días. Se calcula el % de células adheridas en función del tiempo, y se obtienen las curvas de proliferación celular con las que se calcula la tasa de crecimiento específico y el tiempo de duplicación celular. La valoración de las proteínas totales permite conocer la capacidad de material para la absorción proteica en su superficie.

Para una óptima interpretación de los resultados, este test suele ir acompañado de la medición de los ángulos de contacto superficial, según la técnica de la gota de agua. Así, superficies con alto ángulo de contacto presentan baja energía superficial, alta capacidad de fijar proteínas y en definitiva alta adherencia celular.

e) *Valoración de la producción de colágeno I y III de células fibroblásticas humanas.* Evalúa la biocompatibilidad específica de los biomateriales en contacto directo con fibroblastos de piel de origen humano (Michel, 1988).

f) *Implantación intramuscular en glúteo de rata.* Valora la reacción tisular que provoca el biomaterial implantado en el interior del músculo glúteo de la rata. El material y el control negativo se implantan en sendos glúteos, mediante trócar o por incisión. Los periodos de implantación son de 4, 7, 31 ó 90 días, tras los cuales se realiza una valoración macroscópica y microscópica del tejido que circunda el biomaterial. Las muestras se procesan histológicamente (tinción con hematoxilina, eosina y tricrómico de Masson) y/o mediante técnicas específicas de tinción de enzimas presentes en los distintos tipos celulares de la reacción inflamatoria (Willians, 1987).

g) *Implantación subcutánea de "cages" en rata.* Evalúa la biocompatibilidad del material y su posible biodegradación según la técnica descrita por Marchant *et al.* (1986). Se implantan dos "cages" subcutáneamente a ambos lados de la columna vertebral, correspondientes al control negativo y al test. A los 4 y 7 días se extrae el exudado de cada "cage". Se realiza un recuento celular diferencial, valoración de

fosfatasas ácidas y alcalinas intra y extracelulares, cuantificación de proteínas totales, albúmina y, alfa, beta y gamma proteínas.

*h) Implantación subcutánea de fibras en rata.* Evalúa la biocompatibilidad y biodegradación de fibras implantadas subcutáneamente en la rata (Ruderman *et al.*, 1986). Se implantan 10 cm de fibra en cada lado del dorso del animal y transcurridos los 31 ó 90 días de implantación se extrae la fibra, se observa bajo microscopio electrónico de scanning, se realizan pruebas mecánicas y se procesa histológicamente para cuantificar la reacción bajo microscopía óptica.

## 1.2 Resultados

Los resultados se presentan según familias de polímeros.

### 1.2.1 Nylons 1,n

Debido a que estos nylons, por sus propiedades fisicoquímicas, no pueden procesarse en forma de fibra se han ensayado en forma de polvo, film obtenido por disolución del polímero en 1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol al 40% y pastillas compactadas de 12 mm de diámetro por métodos "in vitro". Además, concretamente los nylons 1,6, 1,8 y 1,10 se implantaron en el interior de cápsulas de gelatina intramuscularmente, durante periodos de 7 y 31 días, no mostrando ninguno de ellos una reacción superior a la de los controles negativos. Los resultados indicaron que los nylons 1,n son biocompatibles.

### 1.2.2 Copolímeros estadísticos de glicina y de $\omega$ -aminoácidos

La serie de *copolímeros 2/6* fue evaluada mediante el test de contacto directo, test de adherencia celular (film del polímero en 1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol al 40%) y el test de contacto indirecto con agar difusión (polvo). Los resultados obtenidos clasifican a estos polímeros como:

a) Citocompatibles: son materiales adecuados para el crecimiento celular los nylons 2/6 (80:20) y 2/6 (5:95). Tal como puede observarse en la Figura [1] estos nylons presentan una adherencia celular semejante a la del control negativo.

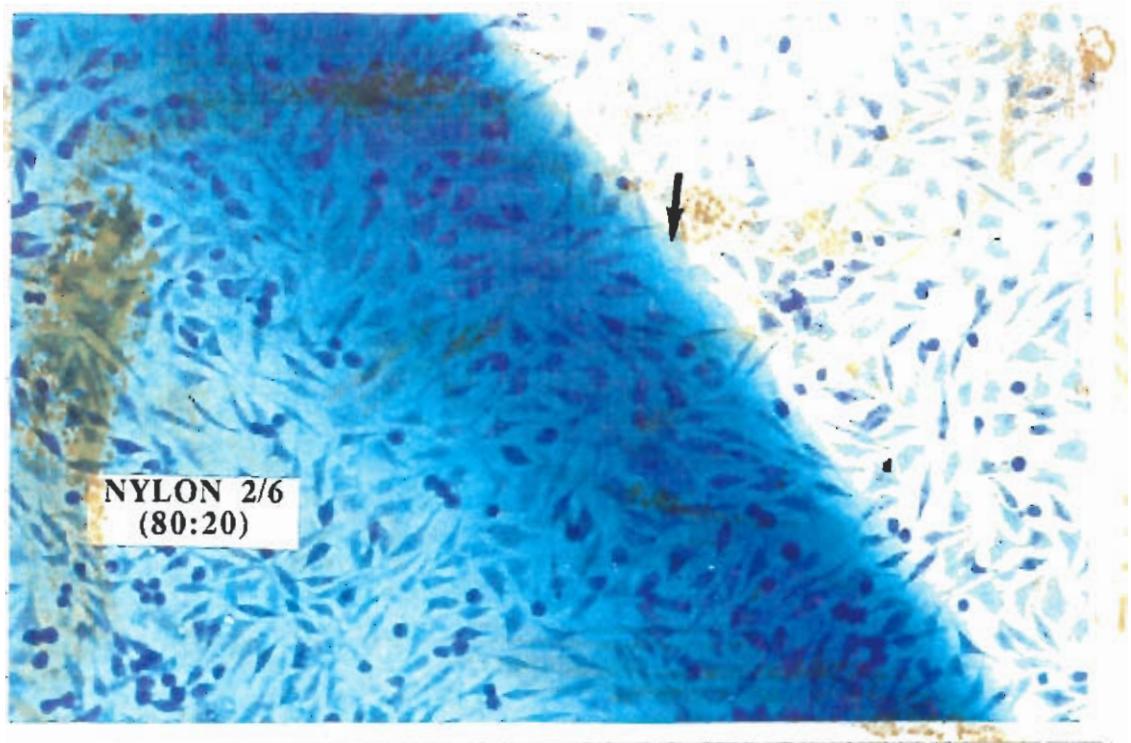


Figura [1]: Nylon 2/6 (80:20). Prueba de contacto directo a las 24 horas. Como puede observarse no hay diferencias entre el cultivo celular que crece sobre el biomaterial (zona de la izquierda) y el que crece sobre la placa de cultivo (zona de la derecha), es decir hay evidencia de un crecimiento normal de fibroblastos en el material.

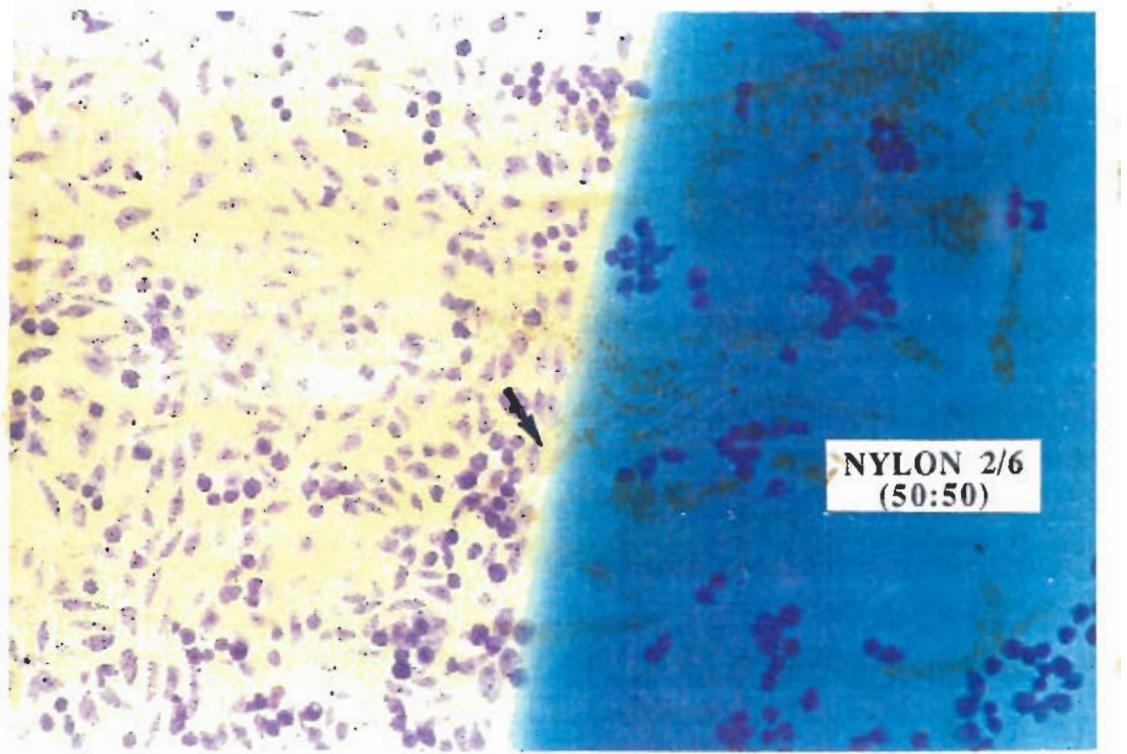


Figura [2]: Nylon 2/6 (50:50). Prueba de contacto directo a las 24 horas. Como puede observarse, hay inhibición del crecimiento celular en la zona de contacto con la muestra (parte derecha). Los fibroblastos se encuentran en suspensión formando agregados celulares.

b) **Baja citocompatibilidad:** estos nylons no son citotóxicos pero presentan alteraciones en la adhesión celular. Se trata de los nylons 2/6 (50:50), 2/6 (20:80) y 2/6 (10:90). Estos nylons, en las pruebas de adherencia celular, presentaron agregados celulares en los cultivos mostrando, también, un porcentaje de adherencia celular inferior al control positivo (Figura [2]).

La cuantificación de proteínas del medio mostró que las formas que presentaban menor adherencia celular presentaban menor concentración de proteínas totales en el medio, por lo que se dedujo que se encontraban fijadas al material.

La serie de los *copolímeros 2/12* se ha evaluado por contacto directo (film obtenido por disolución del copolímero en 1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol al 40%) y por contacto indirecto con agar difusión (polvo) utilizando fibroblastos L929 de ratón. Los resultados clasifican a todos estos polímeros como citocompatibles con la excepción del nylon 2/12 (50:50).

En el caso del **nylon 2/12 (10:90)**, polímero del que resulta muy fácil la obtención de fibras, se valoró la citocompatibilidad basal y específica de dicho material con fibroblastos humanos de piel en forma de film por fusión. Este estudio ha mostrado una ligera citotoxicidad en los tests de rojo neutro de las pruebas de contacto directo, pero esta toxicidad no se indica en los tests del MTT y LDH, por lo que se considera citocompatible. En este material no se ha observado adherencia celular de los fibroblastos durante los 18 días del ensayo.

Las fibras del nylon 2/12 (10:90) se han evaluado mediante implantación subcutánea de jaulas de acero inoxidable (4 y 7 días), implantación intramuscular (31 y 90 días) e implantación subcutánea (31 y 90 días). Los resultados de la implantación en jaulas demuestran la biocompatibilidad de la fibra. Se observa un mayor incremento en la concentración de macrófagos presentes en el exudado que circunda el nylon 2/12 (10:90) que en el del polietileno control en el día 7 del ensayo. Mediante microscopía se pudo observar en la fibra como las células macrofágicas se unían a su superficie, debido a la capacidad de los polímeros en favorecer la adhesión leucocitaria mediante la absorción de proteínas mediadoras en su superficie. Estos parámetros indican cierta actividad degradativa en la fibra. Tras la implantación de las fibras a 31 y 90 días no se observaron diferencias respecto al control negativo, sin embargo hay que destacar la presencia de elevado número de células macrofágicas alrededor del material y células gigantes que indican la degradación superficial del material. En ningún caso se observó una pérdida de la forma de la fibra, ni cambio de afinidad tintorial, ni reacción de inserción de la fibra por parte de las células macrofágicas. Es decir, había degradación únicamente a nivel de superficie.

El **copolímero 2/11 (10:90)** resultó citocompatible en las pruebas de contacto directo con fibroblastos L929 de ratón. El conjunto de pruebas realizadas con fibroblastos humanos demuestra la citocompatibilidad del nylon 2/11 (10:90), tanto en pruebas de contacto directo como indirecto. La incorporación de <sup>3</sup>H-prolina es superior

(mayor síntesis de colágeno I y III) a nivel celular en el nylon 2/11 (10:90) que en el control negativo.

Las fibras de 2/11 (10:90) implantadas intramuscularmente presentaron una respuesta celular a los 31 días donde predominaban los macrófagos y células gigantes en la superficie del biomaterial y una cápsula fibrosa, pero manteniendo la población de macrófagos, a los 90 días. Por otro lado, a nivel subcutáneo, el nylon presentó una reacción ligeramente superior al control negativo a los 90 días de implantación subcutánea, encontrándose macrófagos, células gigantes de pocos núcleos y elevado número de fibroblastos. Ello puede ser debido a que si bien no se ha degradado la fibra si que se observa una cierta actividad enzimática en los márgenes de la misma. Los orificios que presentaba el interior de la fibra estaban ocupados por macrófagos y fibroblastos.

## 1.3 Conclusiones

Se han llevado a cabo pruebas biológicas para determinar el grado de biocompatibilidad y biodegradabilidad de los polímeros sintetizados.

Los nylons 1,n son biocompatibles, pero debido a sus propiedades físicoquímicas no pueden transformarse en fibras.

La serie de copolímeros 2/6 tiene formas citocompatibles como 2/6 (5:95) y 2/6 (80:20), que permiten la adherencia y proliferación de células L929 de ratón. Los nylons 2/6 (50:50), 2/6 (20:80) y 2/6 (10:90) no son citotóxicos pero tampoco son soportes adecuados para el crecimiento celular, debido a la modificación de las proteínas fijadas en su superficie.

De la serie de copolímeros 2/12 son citocompatibles los nylons 2/12 (20:80), 2/12 (10:90) y 2/12 (5:95). Las restantes formas no consiguen la proliferación de células L929 de ratón. El nylon 2/12 (10:90) es biocompatible pero no permite el crecimiento de fibroblastos humanos y la degradación de las fibras únicamente se detecta a nivel de superficie a los 90 días.

El nylon 2/11 (10:90) es biocompatible, con proliferación celular de fibroblastos humanos, y la degradación de las fibras ocurre a nivel superficial a los 90 días de implantación.