



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MATRICES POROSAS OBTENIDAS A PARTIR DE POLI(ϵ -CAPROLACTONA) ADICIONADAS CON COLÁGENA TIPO I Y POLIVINILPIRROLIDONA”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA
ING. ISMAEL GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

TUTOR
DRA. MA. CRISTINA PIÑA BARBA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

COMITÉ TUTOR
DR. ARTURO BARBA PINGARRÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA
DRA. ELIZABETH CHAVIRA MARTÍNEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

MÉXICO D.F.

NOVIEMBRE DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*"...Las flores retoñan y se marchitan, las estrellas brillan pero
eventualmente se apagan;
todo muere, la tierra, el sol y hasta algo tan inmenso como este
universo no es excluido de su fin.*

*Comparado con eso, la vida del hombre es tan efímera,
como abrir y cerrar los ojos.*

*En ese instante el hombre nace,
en ese corto tiempo un hombre crece,
ríe, llora, sufre, se regocija, se lamenta, odia y ama a otros.*

Todo es transitorio...después...todo tiene el mismo destino.

Sakyamuni Gautama

Una lluvia de helechos...

Cuando ésta lluvia cae,

el barco no puede regresar.

Cuando cae la lluvia de helechos,

es momento de decir adiós.

Cuando te diga adiós en la lluvia de helechos...

Sung-Hyun

DEDICATORIA

A aquel que es el camino, la verdad y la vida.

A mis padres y hermanos.

Agradecimientos

A la Dra. Ma. Cristina Piña Barba por su paciencia, impulso y apoyo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Ricardo Vera Graziano y al Dr. Alfredo Maciel por su valioso apoyo en el proceso de electrohilado.

Al Dr. Georges Dreyfus y al Dr. Javier de la Mora por su incondicional apoyo en el proceso de extracción de proteína.

A la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes por ser pieza clave en la investigación y desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Francisco Sánchez, Dr. Omar Novelo, M. en C. Adriana Tejeda, Q.F.B. Damaris Cabrero, Dra. Carolina Guzmán Arriaga, Dra. Ma. Ángeles Aguilar, Ing. Carlos Flores, Ing. Ernesto Sánchez, Dra. Lia Alioth Hoz, M en C. Carolina Guzmán Vázquez, M. en C. Zulema Vargas, M. en C. Gerardo González y M. en C. Karina Gómez por su apoyo en técnicas de caracterización e interpretación de resultados.

Al Instituto de Investigaciones en Materiales – UNAM.

A los compañeros del Instituto de Fisiología Celular - UNAM, Unidad de Medicina Experimental – UNAM y Departamento de Ciencias de la Salud de la UAM unidad Iztapalapa por el apoyo brindado a este trabajo.

Al PAPIIT IT104011 y a CONACYT por el apoyo económico al proyecto.

Resumen

Los implantes estructurados o *scaffolds* han sido ampliamente estudiados con el objetivo de restaurar la función de diferentes tejidos biológicos como: la piel, tejido óseo etc. dando como resultado una disciplina denominada: ingeniería de tejidos.

Para la fabricación de estos materiales se han utilizado varios métodos como: la lixiviación de partículas, *Solvent casting*, moldeo, electrohilado, entre otros. Aprovechando las ventajas de los polímeros biocompatibles, ya sea sintéticos, naturales o de ambos.

En este trabajo, se fabricaron *scaffolds* de poli ϵ -caprolactona (PCL), colágena tipo I (CLG I) y polivinilpirrolidona (PVP) usando la técnica de electrohilado. Se produjeron tres membranas porosas: PCL, PCL-CLG I y PCL - FQL (donde FQL es el copolímero formado por CLG I y PVP).

Los precursores y las membranas se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido, análisis termogravimétrico, calorimetría diferencial de barrido, espectrometría de infrarrojo y ensayo mecánico.

PCL muestra mayor resistencia atribuida a la adición de colágeno. Sin embargo, los cambios en las propiedades térmicas fueron muy pequeños. Del mismo modo, el análisis infrarrojo muestra poca evidencia de la presencia de FQL y CLG I en PCL debido a la pequeña cantidad de estos polímeros.

Abstract

Scaffolds and structured implants have been studied with the goal to restore function of human tissues, such as: skin, bone etc. resulting in tissue engineering.

Several methods of fabrication have been used, such as, lixiviation of particles, solvent casting, molding, electrospinning among others. Taking advantage of benefits from biocompatible polymers, either synthetic, naturals or both.

In this work, polycaprolactone/collagen type I (CLG I)/polyvinylpyrrolidone (PVP) scaffolds were fabricated using electrospinning technique. Three different porous membranes were fabricated: PCL, PCL-CLG I (Polycaprolactone and collagen mixture.) and PCL – FQL (polycarpolactone, polyvinylpirrolione and collagen type I mixture). Were characterized by scanning electron microscopy (SEM), thermogravimetric analysis (*TGA*), differential scanning calorimetry (*DSC*), infrared spectrometry and mechanical test.

PCL shows increased strength attributed to collagen addition. However, changes in the thermal properties were very small. Similarly, the infrared analysis shows little evidence of FQL and CLG I in PCL due to the small amount of these polymers.

ÍNDICE

Resumen	5
Acrónimos y Abreviaturas	9
CAPÍTULO I	
Introducción	10
Justificación	11
Objetivos	12
Objetivo General	12
Objetivos Específicos	12
CAPÍTULO II	
Fundamento Teórico	13
<i>Scaffolds</i>	13
Colágena tipo I	16
Polivinilpirrolidona	18
Poli (ϵ -caprolactona)	19
Electrohilado	21
CAPÍTULO III	
Materiales y Metodología Experimental	24
Materia prima y Reactivos	24
Extracción de colágena	24
Cuantificación de proteína	26
Electroforesis	28
Preparación de compuestos poliméricos	29
Electrohilado de matrices porosas.	30
Caracterización de precursores y matrices obtenidas	32
Microscopía Electrónica de Barrido	32
Análisis Termogravimétrico y	
Calorimetría Diferencial de Barrido	33
Espectroscopia de Infrarrojo	33
Ensayos de tensión	33

CAPÍTULO IV

Resultados y Análisis	35
Extracción de colágena tipo I	35
Cuantificación de proteína	35
Electroforesis SDS-PAGE	37
Microscopía Electrónica de Barrido	39
Análisis de matrices por <i>TGA</i> y <i>DSC</i>	47
Análisis por Espectroscopia de Infrarrojo	51
Ensayos de Tensión	56
CONCLUSIONES	61
Referencias Bibliográficas	63
Anexo I	
Técnicas de Caracterización.....	71
Métodos de Cuantificación de Proteína.....	71
Electroforesis.....	72
Microscopía Electrónica de Barrido	76
Análisis Termogravimétrico <i>TGA</i>	77
Calorimetría Diferencial de Barrido (<i>DSC</i>)	78
Ensayos de Tensión	79

Acrónimos y Abreviaturas.

IIM-UNAM:	Instituto de Investigaciones en Materiales – UNAM.
INR:	Instituto Nacional de Rehabilitación.
CLG I:	Colágena nativa tipo I
PVP:	Polivinilpirrolidona
PCL:	Poli (ϵ -caprolactona)
CLG I – PVP:	Mezcla física de colágena nativa tipo I y polivinilpirrolidona.
FQL:	Copolímero formado por CLG I y PVP.
PCL – FQL:	Mezcla física de PCL y FQL.
SDS-PAGE:	Acrónimo en inglés de sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico).
BSA:	Acrónimo en inglés de Bovine serum albumin (Albumina de suero bovino)
ABS:	Absorbancia
MED:	Media aritmética
DEV:	Desviación estándar
TEMED:	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$.
APS:	Acrónimo en inglés de Ammonium persulfate (Persulfato de amonio) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
PBS:	Abreviatura en inglés de Phosphate buffered saline (Tampón fosfato salino)
SEM:	Acrónimo en inglés de Scanning Electron Microscope (Microscopia electrónica de barrido)
TGA:	Acrónimo en inglés de Thermogravimetric Analysis (Termogravimetría).
DSC:	Acrónimo en inglés de Differential scanning calorimetry (calorimetría diferencial de barrido).
FTIR:	Acrónimo en inglés de Fourier transform infrared spectroscopy (Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier).
ASTM:	American Society for Testing and Materials.
US-FDA:	Food and Drug Administration of the United States.
PGA:	Polyglycolic acid (ácido poliglicólico).
PLA:	Polylactic acid (ácido poliláctico).
HA:	Hydroxyapatite (Hidroxiapatita).
GPC:	Gel Permeation Chromatography (Cromatografía de permeación en gel)

Introducción.

La falta de disponibilidad de tejidos y órganos para trasplantes, así como los complejos problemas asociados a su trasplante, el rechazo inmunológico por el organismo del paciente y la transferencia de patógenos llevó a la necesidad de buscar una alternativa para lograr la regeneración del tejido dañado o funcionalmente deficiente, naciendo así la Medicina Regenerativa o Ingeniería de Tejidos, la cual originalmente era una rama de la Ciencia de los Biomateriales, sin embargo su importancia creció tanto y tan rápidamente que ahora es un campo por derecho propio.

La Ingeniería de Tejidos es un campo multidisciplinario que aplica los principios y métodos de la ciencia de materiales, la bioquímica y la biología celular y molecular para el desarrollo de *scaffolds* con la finalidad de restaurar, mejorar o mantener la función biológica de un tejido u órgano dañado [1,2].

En el grupo de investigación de biomateriales del IIM-UNAM actualmente se está desarrollando un proyecto para la obtención de *scaffolds* de diferentes materiales (naturales y sintéticos) que puedan ayudar en la regeneración de diversos tejidos del cuerpo humano, principalmente de hueso, tráquea, uretra e hígado, y se está trabajando en colaboración con grupos de investigación del INR, Hospital Gea González, ISSSTE, y Hospital General. En este trabajo se realizó un andamio a partir de colágena y ϵ -caprolactona para estos fines.

Justificación

La fabricación de un andamio o *scaffold* que pueda ser coadyuvante durante la reparación de un tejido biológico llevó a la propuesta de obtener matrices que pudiesen alojar potencializadores de la restauración fisiológica, como es el caso del copolímero compuesto de colágena nativa tipo I y polivinilpirrolidona, que da como resultado un material que posee propiedades inductoras de la cicatrización y de la regeneración tisular [1], debido a que este copolímero tiene efectos moduladores sobre el metabolismo de la colágena y de la osteonectina y elastina y en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias [2,3]. Estas propiedades son potenciales en la reconstrucción de tejidos, tales como la piel y el hueso.

Para formar la matriz porosa y aumentar el tiempo de reabsorción se combina con poli(ϵ -caprolactona), polímero biocompatible utilizado eficientemente en aplicaciones médicas tales como, suturas quirúrgicas e implantes cuya función terapéutica es temporal [4-5].

Dadas las características de los componentes que constituyen a las matrices, éstas podrían ser usadas como medio de andamiaje celular y acelerador de la recuperación de tejidos dañados en casos clínicos, tales como cirugías o quemaduras dérmicas entre otros.

Objetivos

Objetivo general

Fabricar a través de la técnica de electrohilado, matrices porosas, utilizando como base poli (ε-caprolactona) y un copolímero compuesto de colágena nativa tipo I y polivinilpirrolidona.

Objetivos Específicos

1. Obtener colágena nativa a través de un proceso enzimático, disolución y precipitación.
2. Cuantificar la proteína obtenida, para conocer su relación masa/volumen en solución y utilizarlo al identificar la proteína a través de la técnica de electroforesis.
3. Obtener un copolímero a través de la irradiación gamma de mezcla física CLG I-PVP.
4. Formación de matrices porosas homogéneas con las mezclas físicas: PCL-FQL y PCL-CLG I a través de la técnica de electrohilado.
5. Caracterización fisicoquímica de las matrices, como preliminar para realizar estudios posteriores.

Fundamento Teórico

Scaffolds.

Los andamios o *scaffolds* (en inglés) son dispositivos auxiliares en la restauración de tejidos, generalmente son sólidos porosos fabricados a partir de biomateriales naturales o sintéticos.

La implantación de estos andamios permite la recuperación de órganos o tejidos al imitar la matriz extracelular, la cual funciona como un medio de integración fisiológico que permite el crecimiento celular. Esta se encuentra formada por diferentes tipos de macromoléculas que definen su arquitectura; los componentes básicos son: el sistema colágeno, el sistema elástico (formado por elastina), glicoproteínas, los glicosaminoglicanos y los proteoglicanos. [3] Estos componentes son generalmente producidos por la célula o los aporta el torrente sanguíneo. [4] Estas macromoléculas forman el medio donde las células subsisten, se reproducen y desempeñan sus funciones.

La fabricación de matrices con estructuras similares a la matriz extracelular tiene un alto potencial en la ingeniería de tejidos y en aplicaciones de regeneración de órganos. [5]

Estas matrices pueden proveer el soporte necesario para la proliferación celular además de inducir procesos sintéticos en sitios anatómicos donde parte de un tejido u órgano ha sido removido debido a un trauma o intervención quirúrgica [6]. Por estas razones los andamios deben soportar el crecimiento y diferenciación celular, mantener una estructura tridimensional y eventualmente degradarse y reabsorberse o incorporarse al nuevo tejido generado.

Otra propiedad esencial es proveer una adecuada interacción o comunicación entre células individuales y sus vecinas próximas. Por lo que las estructuras deben de ser altamente porosas. [7,8], en un intervalo de 100 a 900 μm [9,10] e incluso hasta 2mm [11], dependiendo del tejido que se pretende restaurar, sin tener una pérdida considerable de sus propiedades mecánicas, dado que deben ser físicamente manipulables para su aplicación clínica. Por lo que la forma de un andamio celular y su

morfología son elementos cruciales para su desempeño mecánico y su respuesta biológica.

Estrada, Paz y López (2005) [10] enlistan una serie de características básicas que deben poseer los andamios o *scaffolds* usados en la ingeniería de tejidos, principalmente en regeneración ósea:

- 1) *Biocompatibilidad*. Como capacidad del material para no causar efectos fisiológicos potencialmente dañinos. [12]
- 2) *Porosidad*. necesaria para la vascularización y procesos metabólicos durante la actividad celular. [13]
- 3) *Tamaño del poro*. Adecuado para la migración celular. [14]
- 4) *Propiedades de la superficie*. La morfología y química de la superficie son cruciales para adhesión y proliferación celular [15]
- 5) *Osteoinductividad*: es el proceso por el cual las células osteoprogenitoras son persuadidas y estimuladas por medio de factores de crecimiento y diferenciación para formar hueso nuevo. [16,17]
- 6) *Osteoconductividad*. capacidad del material para actuar como andamiaje y soportar el acoplamiento celular. [16,17]
- 7) *Propiedades mecánicas*. Deben de ser similares a las del sitio de implantación.
- 8) *Biodegradabilidad*. La velocidad de degradación debe estar en el intervalo de la formación del nuevo tejido, de tal manera que, para cuando la lesión esté totalmente regenerada, la matriz tridimensional se haya degradado totalmente. [17,18,19]

Existen *scaffolds* fabricados de diferentes polímeros biodegradables; sintéticos como: ácido poliglicólico, poli (ϵ -caprolactona), poli (ácido láctico) [20-23]; y naturales como el quitosán y colágena [24] por mencionar algunos.

Siendo los fabricados a partir de colágena uno de los más importantes debido que es la proteína que constituye gran parte de la arquitectura de la matriz extracelular de los mamíferos. [25]

La fabricación de *scaffolds* se ha realizado a partir de diferentes técnicas, creando básicamente estructuras continuas y porosas. Sin embargo cada técnica de elaboración le confiere al andamio final características estructurales diferentes, por lo que es muy importante elegir la técnica correcta según la aplicación final del andamio [26]. Algunas de las técnicas más convencionales se describen a continuación.

Solvent Casting: Es un proceso en el que materiales seleccionados se inyectan o vierten sobre moldes previamente manufacturados, de los cuales una vez fijada la matriz o membrana se retira fácilmente. [27] Para este proceso es necesario el uso de disolvente que se evaporan durante el proceso dejando una película o estructura que será utilizada como andamio. [28]

Lixiviación de partículas: Esta técnica consiste en preparar una solución polimérica con adición de partículas salinas o materiales solubles en agua, con un tamaño específico y un disolvente, hasta tener una suspensión homogénea [29]. A la cual se le deja evaporar el solvente para dejar un volumen con cristales de sal embebidos sobre todo el sólido, estas sales se disuelven para dejar una estructura porosa [30], dejando un andamio en 3D.

Actualmente métodos de sinterización [31] y fusión [32] han sido usados para la preparación de andamios para soporte en el cultivo de células capaces de imitar el entorno natural de los tejidos [33,34].

Electrohilado: es otro método para la preparación de membranas porosas, pues resulta versátil y muy atractivo para la preparación matrices hiladas, debido a que es posible controlar su morfología y funcionalidad. [35] Este método consiste en producir fibras de diámetros que van de algunos micrómetros llegando a un orden de unos 100 nanómetros [36], utilizando un dosificador para un polímero en solución y un campo magnético para originar hilos muy delgados que se depositan en un colector.

Se han realizado diversos trabajos sobre el electrohilado de andamios utilizando principalmente PCL en combinación con otros polímeros, como quitosano [37], polidiidopropilfumarato[38], polietilenglicol [39], colágena tipo I [40], entre otros. Estos andamios se han utilizado principalmente como medios de cultivos celulares, liberación controlada de factores de crecimiento, proliferación y diferenciación de células madre [40,41], y de líneas osteoblásticas [38].

Colágena tipo I

La colágena es una proteína en forma de fibras que mantiene la fuerza y flexibilidad de los tejidos biológicos. Estas fibras se denominan fibras colágenas y se encuentran en todos los organismos pluricelulares y son secretadas por células del tejido conjuntivo como los fibroblastos. [42] Es el componente más abundante de la piel y de los huesos, cubriendo casi un 25% de la masa total de las proteínas en los mamíferos. [43]

Existen diferentes clases de colágena de acuerdo a su estructura molecular aunque todas las clases de colágena forman una triple hélice, sin embargo la longitud de la hélice, así como la naturaleza y tamaño de la porción no helicoidal de la molécula es lo que varía de tipo en tipo. [44]

El tipo de colágena que atañe a este trabajo es la colágena tipo I llamada así por ser la primera colágena caracterizada, debido a que es la más abundante en el organismo.

A nivel estructural esta proteína forma fibrillas de 300 nm de largo y 1.5 nm de diámetro. Dicha fibrilla se muestra como un heterotrímero que consta de 2 cadenas α_1 idénticas y una cadena α_2 [$\alpha_1(I)_2\alpha_2(I)$]. Cada cadena α tiene 1,050 residuos de aminoácidos que adoptan una conformación helicoidal dextrógira donde cada giro posee 3.3 residuos de aminoácidos. La conformación helicoidal de la colágena a través de sus grupos peptídicos se puede observar en la Figura 1.

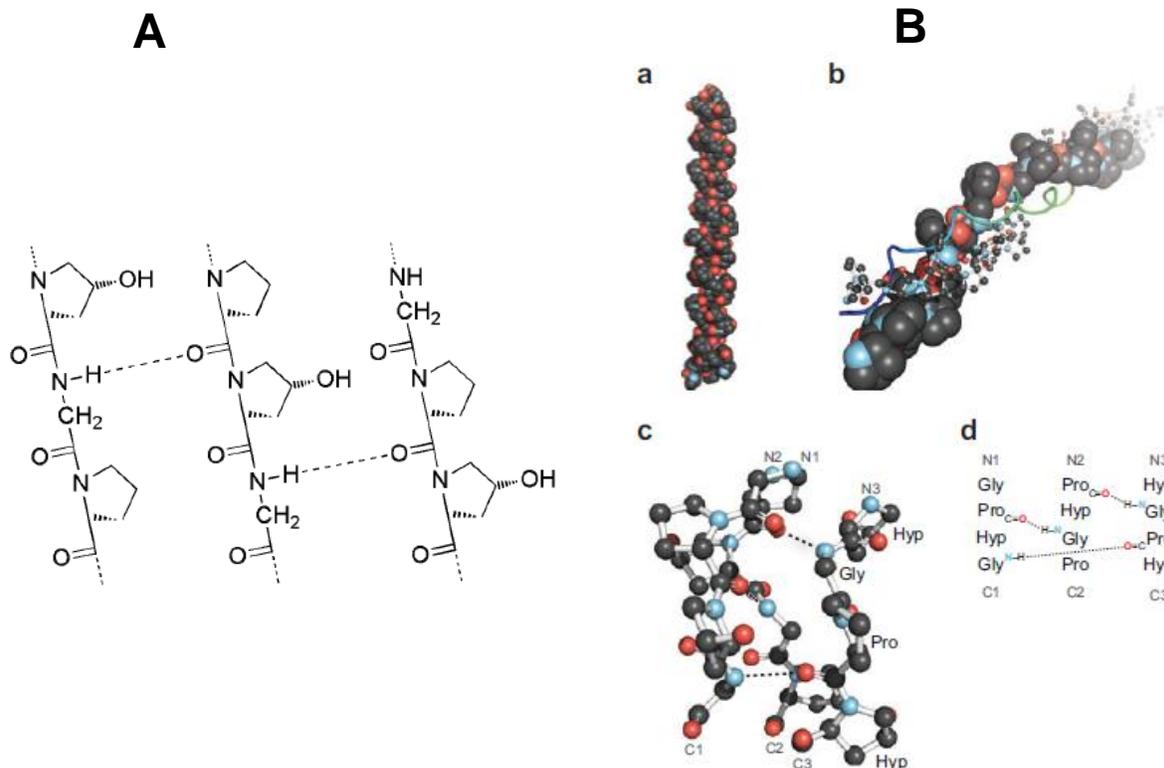


Figura 1. A) Modelo de la estructura colágena con los enlaces amida [45]. B) Arreglo estructural con la secuencia de aminoácidos que forman el modelo helicoidal [46].

El análisis microscópico de las fibras de colágena tipo I muestra una organización en forma de bandeo cruzado con intervalos de 67 nm. Finalmente, este tipo de colágena, se asocia con los tipos III, IV, VI, XII y XIV, así como con otras proteínas no colagénicas [47,48].

La colágena tipo I en forma nativa o desnaturalizada se utiliza en la fabricación de apósitos o como sustrato para ingeniería tisular ya que su biocompatibilidad y propiedades biodegradables son únicas. [49] Se ha potencializado su uso como andamiaje celular en tejidos como el hueso, donde se ha demostrado que promueve la osteointegración [50,51]; mientras que en el cartílago, favorece la reconstrucción de la forma y la función del menisco medio en humanos [52]. Del mismo modo, en

combinación con hidroxiapatita o nano-hidroxiapatita, favorece la regeneración de hueso en modelos animales [53,54].

Es usada en forma de solución, membranas o esponjas según sea la aplicación

Poli(vinil pirrolidona) (PVP).

El homopolímero de N-vinil-2- Pirrolidona es un polímero biológicamente inerte [55], soluble en agua y en otros solventes polares. Tiene excelentes características de adherencia y formación de películas [56].

El PVP se obtiene por la polimerización radical de vinilpirrolidona, resultando en estructura en la Figura 2.

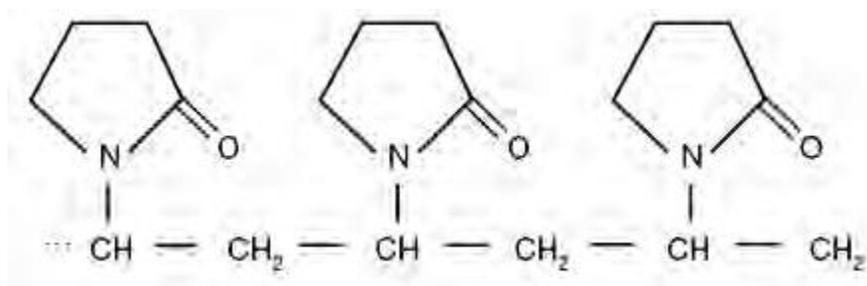


Figura 2. Estructura química del Polivinilpirrolidona. [57]

Después de la polimerización, el producto es secado se lleva ya sea por pulverización o secado en tambor. Esto da como resultado un polvo blanco con tonalidades amarillas.

Los polímeros de PVP con diferentes masas moleculares son distinguidos de acuerdo al número-K, existiendo así los tipos K-12, K-15, K-17, K-30 que son utilizados para administración parenteral en preparaciones veterinarias y humanas; mientras que los tipos K-25 y K-30 son utilizados para la fabricación de productos administrados por vía oral y tópica como son, los farmacéuticos orales, los alimentos, las cremas y los cosméticos [58].

Existe un gran número de datos experimentales que fundamentan su seguridad e inocuidad. Este polímero es prácticamente no metabolizable y se excreta principalmente por vía urinaria (95% en un periodo menor a 24 horas) [55]

Poli(ϵ -caprolactona) PCL

Es un polímero termoplástico, poliéster alifático derivado de la síntesis química del petróleo crudo. Aunque este polímero se produce a partir de materias primas no renovables es totalmente biodegradable. [59]

El PCL posee una buena resistencia al agua, aceite, cloro, siendo soluble en solventes orgánicos. Es un polímero semicristalino, presenta un bajo punto de fusión de 59-64°C y una temperatura de transición vítrea de -60°C [60]

Se obtiene mediante una reacción de polimerización de apertura de anillo a partir de la ϵ -caprolactona, utilizando como catalizador el octanoato de estaño, como se muestra en la Figura 3. [61]

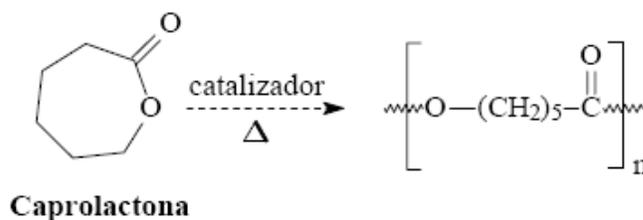


Figura 3. Síntesis de la poli(ϵ -caprolactona).

Se usa principalmente en poliuretanos termoplásticos, resinas para revestimientos de superficies, adhesivos, dispositivos médicos, entre otros. [59]

Debido a sus características de resistencia y biodegradación ha sido eficientemente utilizado en aplicaciones médicas específicas tales como, suturas quirúrgicas e implantes

cuya función terapéutica es mecánicamente temporal [62-63]. Se ha usado además como dispositivo de administración de fármacos. Lo cual consiste en mezclar de manera controlada el polímero y el fármaco implantándose en un tejido específico, donde se liberará conforme a la degradación del PLC. [64]

La toxicidad del PCL ha sido ampliamente estudiada como parte de la evaluación de Capronor [101], material que tiene como principal componente la policaprolactona usado en dispositivos de liberación controlada de anticonceptivos. Ha sido aprobado por la US-FDA y es actualmente considerado como no tóxico y biocompatible [64].

Los enlaces ésteres de este polímero son susceptibles a la hidrólisis lo cual provoca su degradación en medios fisiológicos. Sin embargo su tiempo de degradación *in vivo* es relativamente elevado, de hasta 3 años, a causa de su estructura semicristalina y dependiendo de su peso molecular inicial [65].

En comparación con otros materiales de uso común, tales como andamios de ácido poliláctico (PLA) y el ácido poliglicólico (PGA), el PCL tiene buenas propiedades mecánicas y puede ser fácilmente procesado [66].

Sin embargo, debido a sus propiedades hidrofóbicas intrínsecas y la falta de grupos funcionales bioactivos, el PCL no fue muy favorable en una primera etapa para el crecimiento celular, lo que limitaba sus aplicaciones a la ingeniería de tejidos [67].

Muchos métodos han sido desarrollados para modificar la superficie del andamio para mejorar su biocompatibilidad [68-73]. Entre estos métodos, la modificación de materiales sintéticos con los productos naturales es una manera sencilla y eficaz para preparar el andamio híbrido con ventajas combinadas de los componentes, aunado a esto la velocidad de degradación del PLC se puede aumentar mediante la copolimerización o mezcla con polímeros hidrófilos [60] o por adición de ácido oleico o aminas terciarias, que catalizan la reacción de hidrólisis [61] dado que es susceptible a formar mezclas compatibles con una amplia variedad de polímeros [74].

Su degradación *in vivo* ocurre en dos etapas. En primera instancia ocurre una ruptura de cadenas debido a la hidrólisis, de forma que disminuye el peso molecular, [61] y posteriormente estas cadenas más pequeñas y porciones de bajo peso molecular, son

transportadas fuera del sitio de implantación por los fluidos del cuerpo o por fagocitosis [62].

Debido a que el PCL se ha mezclado, copolimerizado o injertado con otros polímeros hidrófilos, se ha fabricado en una variedad de formas tales como membranas, películas, matrices, fibras, entre otras, con la finalidad de producir andamios para el crecimiento de células tales como los fibroblastos dérmicos humanos y mioblastos, ya que el copolímero proporciona una buena superficie química para la fijación de dichas células [63] al ser mezclado con otros polímeros hidrófilos. Incluso se han reportado matrices fabricadas a partir PCL PCL/HA utilizadas como tutores del crecimiento de osteoblastos para la reparación ósea. [64]

Electrohilado

El electrohilado es una técnica muy utilizada para la producción de fibras poliméricas con diámetros a escala nanométrica y micrométrica. [75]. Este proceso fue descubierto por Formhals [76] en 1934 y se ha estudiado desde la primera mitad del siglo XX [77]. Ha tenido un crecimiento acelerado desde el 2003 tal como se muestra en la Figura 4. En la que se observa el incremento de publicaciones cada año hasta el 2008. [78]

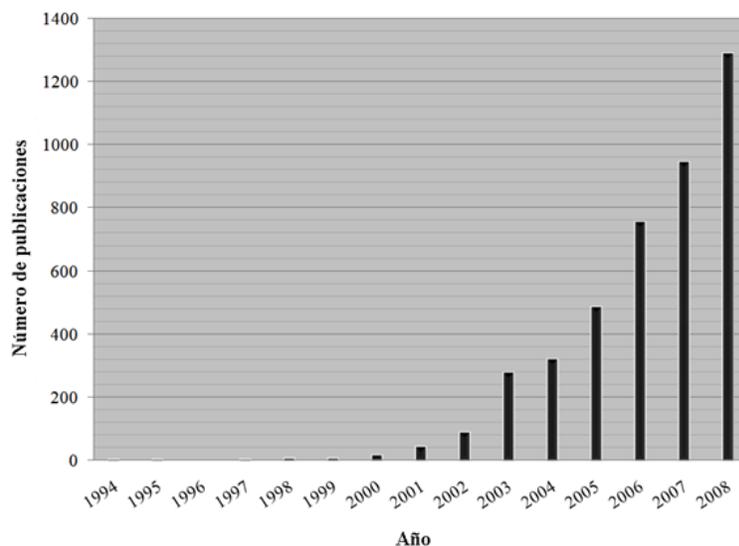


Figura 4. [78] Tabla comparativa de publicaciones relacionadas al proceso de electrohilado hasta el año 2008.

Recientemente Reneker y colaboradores [79,89] han investigado este proceso con gran detalle demostrando su versatilidad para generar nanofibras a partir de polímeros [81], cerámicos [82], metales [83] y compuestos [84-87]. Existen diferentes aplicaciones potenciales para el uso de nanofibras, tales como: refuerzos para *composites*, filtros, cosméticos, textiles, sensores, ingeniería de tejidos biológicos, entre otros. [188]

La técnica de electrohilado permite producir materiales de uso médico con estructuras nanofibrosas [89,90] basados en polímeros naturales tales como: colágena, quitosan, ácido hialurónico; y de polímeros sintéticos entre los que se encuentran: el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, policarbonato, etc. Estos han sido utilizados para la regeneración de tejidos, [91,95] debido a sus características morfológicas, puesto que las redes nanofibrosas producidas a partir de estos materiales han demostrado favorables respuestas biológicas [96], pues se ha observado que mejoran la regeneración de tejidos como el hueso, cartílago y tejidos cardiovasculares; debido que se fomenta una adecuada organización alrededor de fibras de diámetros pequeños, similares a los de las células. Esto puede ayudar a disminuir la formación de tejido cicatricial. [95-97]

Un proceso típico de electrohilado consiste en hacer fluir un polímero contenido en un depósito con una bomba de infusión que suministra un flujo constante y determinado, por medio de una aguja metálica, la cual está conectada a una fuente de alto voltaje de hasta 30 kV [98] y esta a su vez a un colector de cobre u otro metal que recupera las fibras. Para obtener matrices, se depositan las fibras en el colector durante un tiempo determinado hasta lograr un espesor deseado.

Durante este evento la solución polimérica se ubica dentro del capilar de la jeringa que actúa como electrodo conectado a la fuente de alta tensión y a un metal colector. Cuando la superficie de la gota suspendida sobre la punta de la aguja se carga eléctricamente por la aplicación de un campo eléctrico se provocan dos tipos de fuerzas electrostáticas: la fuerza de repulsión entre las cargas superficiales y la fuerza coulombica ejercida por el campo eléctrico externo. Debido a estas interacciones la gota se deforma formando un volumen llamado *cono de Taylor*. Una vez alcanzado un voltaje determinado y dependiendo de las características del polímero; se supera la tensión

superficial y se expulsa un *jet* que en un punto se deforma por acción de movimientos conocidos como *whipping* dando como resultado hilos muy delgados que pueden llegar a tener diámetros de varios cientos de nanómetros [99]. Durante el trayecto el solvente utilizado en la solución se evapora dejando hilos muy delgados que se depositan en la plataforma metálica.

La utilización de solventes muy volátiles ayudan a obtener fibras mejor definidas, ya que al evaporarse en el trayecto, las fibras llegan al colector con una mínima cantidad de disolvente, lo que ayuda a evitar la deformación diametral de las mismas al impactarse con el electrodo. Sin embargo es recomendable usar solventes que no sean altamente tóxicos, como: acetona, diclorometano y ácido fórmico. [98].

Existen diversos parámetros involucrados durante el proceso de electrohilado. Estos parámetros dictarán las características dimensionales, morfológicas, de textura y de manipulación entre otras.

Algunos de los parámetros que se pueden controlar son característicos de la solución, tales como: aspectos termodinámicos del solvente y del polímero, solubilidad del polímero en el solvente, [99] viscosidad etc. Los que dependen del equipo de electrohilado son: distancia entre electrodos (aguja y placa colectora), voltaje aplicado por la fuente de poder, caudal del polímero en el depósito, características ambientales de la cámara etc.

Uno de los problemas más comunes durante el proceso de electrohilado es la formación de formas semiesféricas llamadas cuentas, que se observan intercaladas a lo largo de las fibras. Dado que estas formaciones dependen de varios factores tales como: propiedades reológicas del polímero [99] y el incremento excesivo de voltaje [100,1101]. Es necesario adecuar el sistema hasta obtener líneas continuas, para lograr matrices homogéneas. Siendo esto un ejemplo de la importancia del control de las variables en este proceso.

Materiales y Metodología experimental.

Materia prima y reactivos.

- **Obtención de colágena.**

Para obtener la colágena se partió de tendón de Aquiles de bovino

Los reactivos utilizados usados fueron: Pepsina de mucosa gástrica porcina (Sigma-Aldrich), CH_3COOH (J T Baker), Na_2HPO_4 (Fluka), NaCl (Sigma-Aldrich), Tris-HCl (Sigma-Aldrich).

- **Cuantificación de Proteína**

Inhibidor de proteasas (Roche), Albúmina Suero Bovina BSA 1:100 (Proliant), Reactivo Bradford (Bio-Rad).

- **Electroforesis**

Tris-HCl (Sigma-Aldrich). SDS (Fluka), azul de bromofenol, poliacrilamida (J.T. Baker), Azul de comassie brilliant blue R250 (Bio-Safe).

- **Electrohilado**

La materia prima y los reactivos utilizados para el proceso de electrohilado fueron: Poli (ϵ -caprolactona) Mn: 80,000 (GPC) (Sigma-Aldrich), PVP-K15 (Mn: 15,000) (Sigma-Aldrich), colágena nativa TI de bovino, (2,2,2)- Trifluoretanol (Fluka), Cloroformo (J.T. Baker).

Extracción de colágena.

El proceso de purificación de colágena tipo I se basó en los métodos de Edward J. Miller y R. Kent Rhodes [102] y Takeshi Nagai*, Nobutaka Suzuki [103]. En los que se plantea la depuración de CLG I a partir de diferentes tejidos con procesos muy similares en los que se describe la extracción y purificación de la proteína a partir de una solubilización del tejido y un proceso enzimático.

La extracción de CLG I a partir de tendón de Aquiles de bovino se realizó en 5 etapas que se desarrollaron como se indica en la siguiente descripción:

Etapa I Limpieza y liofilizado de la materia prima.

Se removió el tejido adiposo y fascias que constituyen al tendón, a continuación se seccionaron los elementos más pequeños y se lavaron con acetona para eliminar remanentes de tejido sin utilidad para el proceso. La acetona se eliminó y se lavó el tejido con agua destilada. Una vez limpias las secciones de tendón se liofilizaron en un equipo FreZone 1L Benchtop FDS Labconco US, a aproximadamente $-49\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una presión de vacío de 0.030 mbar.

Etapa II Solubilización y homogenización del tejido inicial.

Las secciones de tendón liofilizadas se sumergieron en ácido acético (CH_3COOH) al 0.5 M a una relación de 1:100 (g/mL) manteniendo en agitación durante 24 hrs a 4°C para inducir la pérdida de la estructura secundaria de la proteína. [104] Posteriormente se homogenizó con un procesador de cuchillas minipimer Braun US, hasta obtener un gel traslúcido como se muestra en la Figura 5.



Figura 5. Solubilización de tendón (a) en ácido acético 0.5 M hasta la obtención de un gel traslúcido (b).

Etapa III Proceso enzimático.

Terminado el proceso de homogenización se agregó Pepsina de mucosa gástrica porcina al gel a una relación de 1:10 [g/g] respecto a la masa seca del tendón, con la finalidad de romper los enlaces de telopéptidos que mantienen unidas a las moléculas de colágena. La mezcla se agitó durante 24 h. Terminado este proceso se separaron fracciones de 50 mL para poder procesar la mezcla a pequeña escala. Para eliminar los remanentes se centrifugó en un equipo Avanti J-26XPI Beckman Coulter US, rotor JS-7.5

a una velocidad de 6000 rpm durante 60 min. La solución obtenida se dializó en un buffer de fosfatos Na_2HPO_4 0.02 M para desactivar la función enzimática.

Etapas IV Ciclos de precipitación y disolución.

La solución se centrifugó en un equipo Optima XL-100K Ultra Beckman Coulter US, rotor 60Ti a una velocidad de 30000 rpm, se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en ácido acético (CH_3COOH) al 0.5 M por 2 h con agitación. A continuación se agregó NaCl obteniendo una solución al 0.7 M manteniendo en agitación durante 24 h como primer ciclo de precipitación.

Al finalizar el primer ciclo de precipitación la solución se centrifugó en el mismo equipo a 30000 rpm. Se formó un *pellet* como precipitado y se desechó el sobrenadante. El precipitado se suspendió en ácido acético (CH_3COOH) 0.5 M y se adicionó NaCl para formar una solución 2.3 M manteniéndose en agitación por 24 h para volver a centrifugar a 30000 rpm y extraer el precipitado y posteriormente suspender en TRIS-HCl 50 mM pH 7.4 en agitación durante 24 h a 4°C.

Etapas V Diálisis de la solución.

La solución se centrifugó a 30000 rpm y el precipitado se suspendió en ácido acético 0.5 M, la solución formada se dializó en ácido acético 5mM por un periodo de 2 h y posteriormente se dializó en agua destilada durante 2 h. El proceso de dializado se repitió una vez. Al finalizar el proceso se tomaron alícuotas de 1 mL y se liofilizaron para obtener la proteína en seco.

Cuantificación de proteína

Con el fin de conocer la cantidad de proteína presente en la solución de colágena purificada se cuantificó el método de Bradford, que consiste en emplear un colorante hidrofóbico cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico tienen un color pardo y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente en un espectrofotómetro.

Para la preparación de las muestras a medir, la colágena se desnaturalizó utilizando un inhibidor de proteasas en PBS con pH 7 (Roche) en una disolución con relación 1:1 CLG TI-PBS. De este volumen se separaron cuatro muestras que se centrifugaron en un equipo Eppendorf 5417R a una velocidad de 14000 rpm a 4°C durante 30 min y se separaron alícuotas dobles por cada muestra y se generaron los blancos a medir (Figura 6).

Para formar la curva estándar se utilizó albúmina sero bovina (BSA) como se muestra en la Tabla 1. Para realizar el ensayo se utilizó un equipo de espectrofotómetro DU 800 Beckman Coulter, US, usando una longitud de onda de 595 nm en absorbancia.

Tabla 1. Resultados para el estándar de proteína BSA.

Tubos	Reactivo		
	BSA $\mu\text{g/ml}$	Estándar BSA (0,5 mg/ml) μl	Reactivo de Bradford ml
Blanco	0	0	2
1	2.5	5	2
1	2.5	5	2
2	5	10	2
2	5	10	2
3	10	20	2
3	10	20	2
4	15	30	2
4	15	30	2
5	20	40	2
5	20	40	2



Figura 6. Muestras con tinción que esquematiza la concentración de proteína por intensidad de color.

Electroforesis

Para aproximar el peso molecular e identificar la proteína purificada se utilizó la técnica de electroforesis SDS-PAGE, en la que se observó el desplazamiento de sus unidades proteicas en un medio electroforético. Este desplazamiento es proporcional a su peso molecular, provocado por la aplicación de un campo eléctrico.

Se preparó una solución amortiguadora usando agua desionizada, SDS 10%, 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, glicerol y azul de bromofenol como indicador de pH. A esta mezcla se cargó la muestra de colágena obtenida en una proporción de 1:1 usando 15 μ L de muestra y 15 μ L de amortiguador y se calentaron durante 10 min. Junto a estas muestras se calentó un marcador de peso molecular (caleidoscopio) y un marcador de bajo peso molecular para realizar comparaciones al final de la corrida.

Se prepararon por duplicado dos geles discontinuos usando un gel separador (agua desionizada, acrilamida 30%, amortiguador pH 8.8, SDS, APS y TEMED) y un gel concentrador (agua desionizada, acrilamida 30%, amortiguador 6.8%, SDS, APS y TEMED). Se cargaron las muestras en un equipo de electroforesis Bio-Rad como indica la Figura 7 (A,B), y se corrió el sistema a 20 mV por un lapso de dos horas (Figura 8A) .

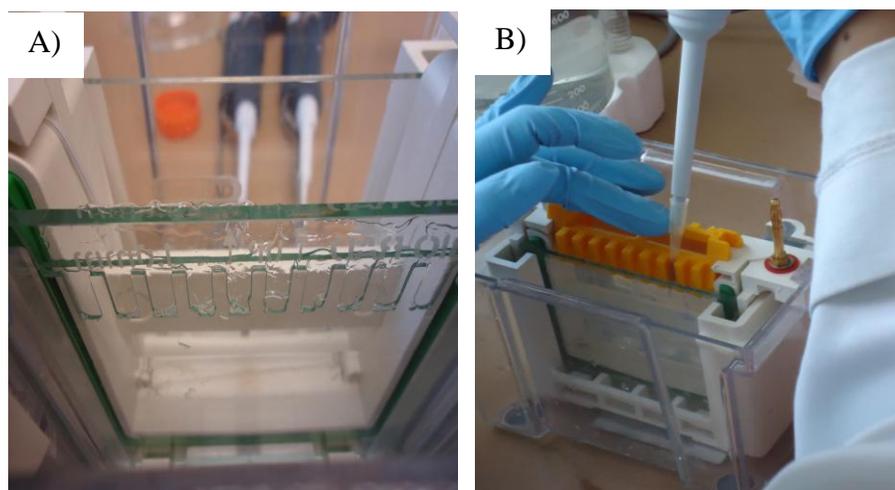


Figura 7. A) Pozos generados en el gel, B) Carga de muestras por pozo.

Una vez corrida la muestra electroforética, se extrajeron los geles para sumergirlos en una solución de tinción por 12 h (Figura 8 B), y finalmente se sumergió en una solución de metanol 40%, ácido acético 10% y agua desionizada 50%, para desteñir el gel. Con lo cual se pueden identificar las bandas correspondientes a la proteína en estudio. Finalmente los geles se sumergieron en una solución fijadora.

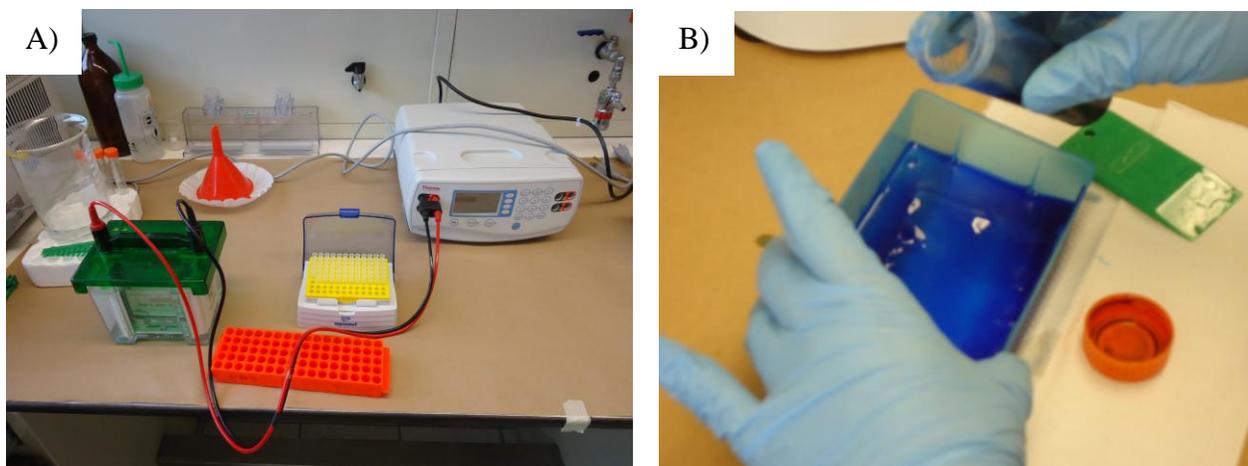


Figura 8. A) Proceso de electroforesis en cámara Bio-Rad a 20 mV. B) Sumergido del gel en la solución de tinción.

Preparación de compuestos poliméricos.

Para formar el copolímero de CLG I – PVP se mezclaron los dos polímeros formando una mezcla física. La mezcla que se sometió a una dosis de radiación gamma a 25 KGray con un equipo GAMMABEAM 651 - PT de alta intensidad. El copolímero resultante se identificó como FQL, se liofilizó y se mezcló en un porcentaje de 0.1% v/v con una solución al de poli ϵ -caprolactona (PCL 12% p/v), para formar una solución PCL-FQL.

Para comparar el efecto de la adición de FQL, se prepararon dos soluciones más, una formada por la mezcla física CLG I-PCL 0.1% (v/v) y otra de PCL sin adicicionantes. Para las tres formulaciones el disolvente utilizado fue 2,2,2- Trifluoretanol (Fluka) y la concentración del PCL en el solvente fue 12%. Previo a la mezcla se obtuvo la concentración del PCL al experimentar en el proceso de electrohilado.

Electrohilado de matrices porosas.

El montaje del sistema de electrohilado se hizo de acuerdo al diagrama de la Figura 9. Para encontrar las condiciones idóneas del electrohilado para cada formulación, se hicieron diferentes procesos variando y combinando las siguientes variables: distancia entre aguja y colector (d), caudal de la solución polimérica (r), voltaje aplicado (V) y concentración de las formulaciones de poli ϵ -caprolactona 10%, 12% y 14%. Las condiciones ambientales se fijaron en $\sim 21^{\circ}\text{C}$ $\sim 46\%$ de humedad. Estos parámetros se aplicaron a todas las formulaciones.

Cada matriz electrohilada se analizó por medio de *SEM*, observando la homogeneidad y grosor de las fibras. Al final se eligieron las condiciones: $d=25$ cm, $r=0.6$ mL/h, $V=15$ kV y PCL al 12% ya que a estas condiciones y con esta formulación las fibras se obtuvieron continuas y homogéneas.

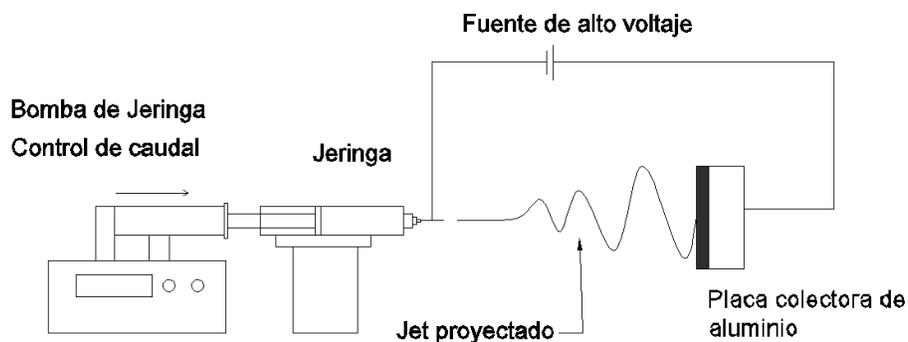


Figura 9. Disposición de los elementos del sistema de electrohilado.

Se realizó la misma cantidad de pruebas que se indican en la Tabla 2 para las formulaciones PCL 10%, PCL12% y PCL14%.

Una vez seleccionada la concentración PCL12% se experimentó con las concentraciones: PCL12% - CLG I y PCL12% - FQL.

Tabla 2. Combinaciones de variables para las formulaciones a electrohilar. Formulaciones 10%,12% y 14%.

No. Prueba	Caudal [mL/h]	Voltaje [kV]	Distancia aguja - colector [cm]
1	0.4	10	20
2	0.5	10	20
3	0.6	10	20
4	0.4	15	20
5	0.5	15	20
6	0.6	15	20
7	0.4	20	20
8	0.5	20	20
9	0.6	20	20
10	0.4	10	25
11	0.5	10	25
12	0.6	10	25
13	0.4	15	25
14	0.5	15	25
15	0.6	15	25
16	0.4	20	25
17	0.5	20	25
18	0.6	20	25
19	0.4	10	30
20	0.5	10	30
21	0.6	10	30
22	0.4	15	30
23	0.5	15	30
24	0.6	15	30
25	0.4	20	30
26	0.5	20	30
27	0.6	20	30

Se produjeron 5 membranas porosas (matrices) de cada formulación manteniendo las mismas condiciones ambientales y de operación, como se indica en la Tabla 3. Las dimensiones de las membranas fueron de 6 cm x 8 cm con un espesor aproximado de 0.1 mm.

Tabla 3. Condiciones de fabricación de las membranas.

	Composición	Volumen (mL)	Voltaje (kV)	Distancia colector – aguja (cm)	Caudal (mL/h)	Condiciones ambientales
Formulación I	PCL12%	3	15	25	0.6	~21°C ~46%
Formulación II	PCL12% - CLG I	3	15	25	0.6	~21°C ~46%
Formulación III	PCL12% - FQL	3	15	25	0.6	~21°C ~46%

Las membranas obtenidas fueron seccionadas en diferentes geometrías para destinar cada elemento a análisis mediante diferentes técnicas.

Caracterización de precursores y matrices obtenidas

Se emplearon las técnicas de caracterización: microscopía electrónica de barrido, análisis termogravimétrico, calorimetría diferencial de barrido, espectroscopia de infrarrojo y ensayos mecánicos de tensión. Estas técnicas se describen en el Anexo I.

Microscopía Electrónica de Barrido.

Las matrices hiladas se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido usando un equipo JSM-7600F JEOL JP. Cada muestra se recubrió por deposición catódica usando un blanco de oro/paladio con el fin de aumentar la conductividad de las membranas y lograr un mejor análisis por microscopía. Durante la elección de las condiciones de electrohilado, las formulaciones depuradas fueron analizadas por microscopía electrónica de barrido con el fin de obtener fibras homogéneas y sin formación de cuentas (formas esféricas unidas mediante fibras del mismo polímero, Figura 10), así mismo se observó la morfología de las fibras comparando las diferencias entre las diferentes formulaciones.

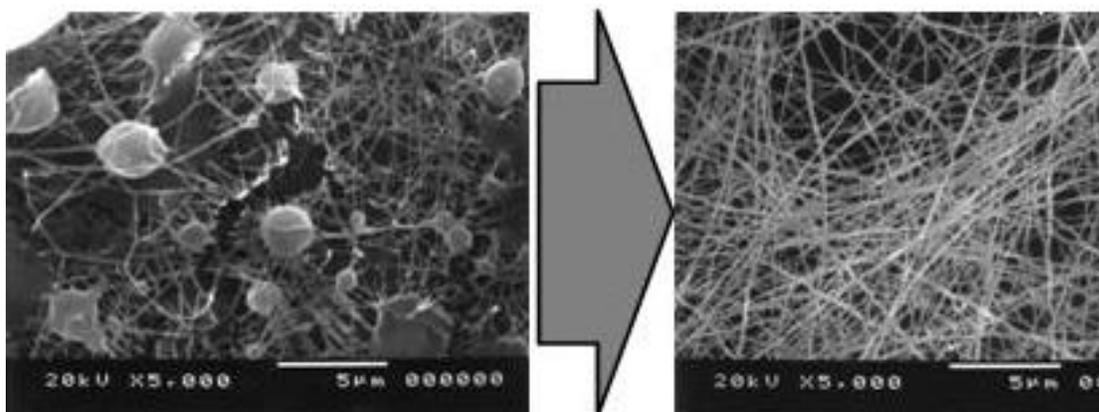


Figura 10. Disminución de formación de cuentas al variar las condiciones de electrohilado. [105]

Análisis Termogravimétrico y Calorimetría diferencial de barrido.

A través de las técnicas *TGA* y *DSC* se analizaron los precursores de las mezclas, así como las tres formulaciones finales, en un equipo DSC 2910 Modulated TA Instruments US. La velocidad de calentamiento para los precursores y las tres formulaciones fue de 10°C /min en un intervalo de 0°C a 500°C para TGA y 0°C a 350°C para DSC en atmósfera controlada.

Espectroscopia de infrarrojo.

Con el fin de ubicar los grupos funcionales de los diferentes compuestos en las membranas se analizó por Espectroscopia de Infrarrojo por transformada de Fourier (*FTIR*). Para esto se utilizó un equipo Smart Orbit Thermo Scientific US. Y se analizaron las muestras:

- PVP Polivinilpirrolidona 25kDa.
- CLG I Colágena TI.
- PCL Poli (ϵ -caprolactona) 80kDa.
- FQL Copolímero de Colágena tipo I y Polivinilpirrolidona.
- PCL – CLG I Mezcla física de Poli (ϵ -caprolactona) y Colágena tipo I.
- PCL – FQL Mezcla física de Poli (ϵ -caprolactona) y FQL.

Pruebas de Tensión.

Se realizaron pruebas de tensión utilizando un equipo MTS minibox 858 (Figura 11.). Para este fin se obtuvieron 5 probetas de cada formulación, bajo la norma ASTM-D1708 [106] con las dimensiones que se indican en la Figura 12.A,B.

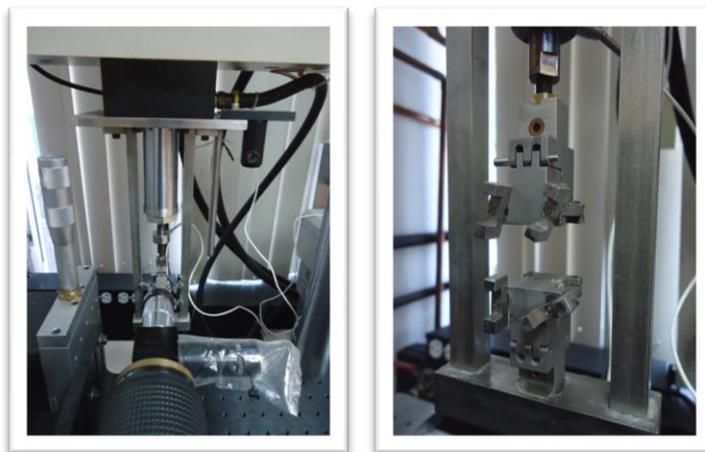
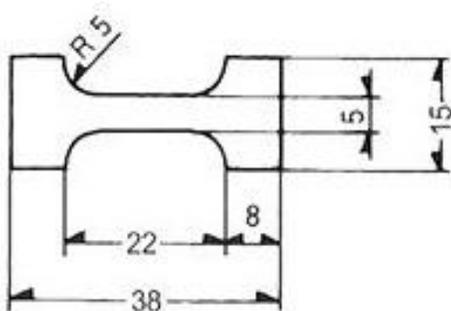


Figura 11. Equipo MTS minibox 858 para pruebas de microtensión.

El espesor de las probetas se determinó obteniendo una media aritmética de mediciones hechas con un micrómetro de espesor MDH-25M. 0.1 μm Mitutoyo MX.

Todas las probetas se analizaron a una velocidad de cruceta de 10mm/min y con una celda de carga de 111.21 N. Los datos obtenidos se analizaron en Origin 6.1 para obtener curvas de esfuerzo-deformación y poder determinar Módulo de Young (E), resistencia a la tensión (σ_u), deformación (ϵ_{TS}), esfuerzo de cedencia (σ_y) entre otras propiedades.

A) ASTM D1708 SPECIMEN [mm]



B) PCL PCL-CLG PCL-FQL

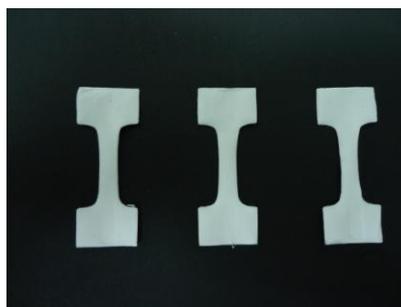


Figura 12. A) Dimensiones de las probetas para pruebas de microtensión bajo la norma ASTM D1708 [41]. B) Probetas seccionadas de las membranas de PCL, PCL-CLG I y PCL-FQL visualmente iguales.

Resultados y análisis.

Obtención de colágena

La colágena obtenida se presentó en forma de gel traslucido como se muestra en la Figura 13A. Después de liofilizar las muestras, la colágena obtuvo una forma esponjosa de color blanco como se observa en la Figura 13B.

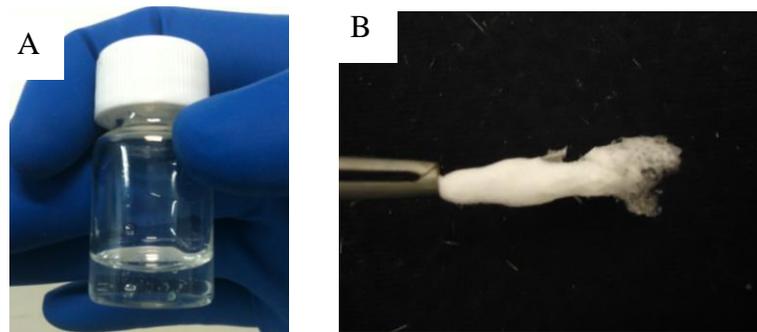


Figura 13. A) Colágena en solución, B) Colágena liofilizada.

Cuantificación de proteína.

La determinación de la cantidad de proteína se realizó por el método de Bradford obteniendo en primera instancia un estándar de una proteína conocida (BSA).

A partir de estos datos se obtuvo la siguiente gráfica (Figura 14.) de la que se interpola para obtener las concentraciones de las muestras en estudio.

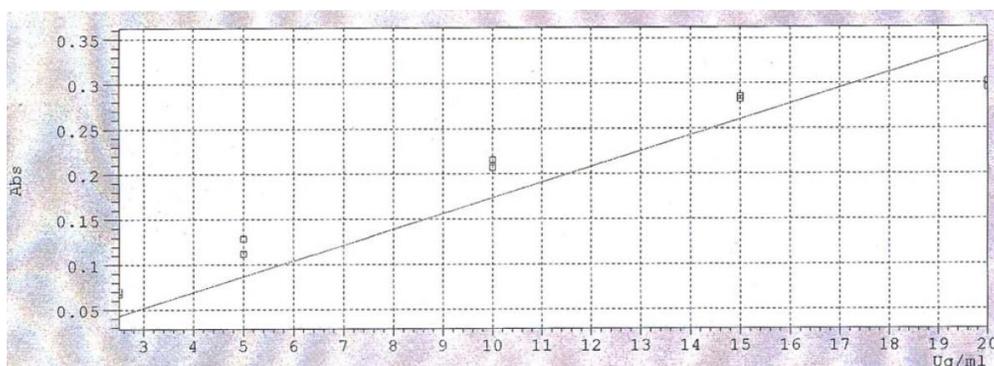


Figura 14. Curva estándar BSA.

Tabla 4. Resultados para la concentración de BSA para estándar.

Estándar	Concentración teórica BSA $\mu\text{g/ml}$	Concentración Calculada BSA $\mu\text{g/ml}$	Concentración MED BSA $\mu\text{g/ml}$	AbS Analítica	Abs Analítica MED+DEV
1	2.5	4.0699	3.9757	0.0706	0.0689 \pm 0.002
1	2.5	3.8815		0.0673	
2	5	6.4588	6.9360	0.1120	0.1203 \pm 0.011
2	5	7.4132		0.1286	
3	10	11.9503	12.1850	0.2072	0.213 \pm 0.005
3	10	12.4197		0.2154	
4	15	16.4627	16.3728	0.2855	0.2839 \pm 0.002
4	15	16.2828		0.2824	
5	20	17.0053	17.2095	0.2949	0.2984 \pm 0.005
5	20	17.4136		0.3020	

Para cada muestra se corrieron dos alícuotas para demostrar su reproducibilidad. Los resultados muestran una cantidad de proteína, correspondiente a la colágena tipo I contenida en 1 μL (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados para la concentración de colágena.

Muestra	A ₅₉₅ nm	Muestra CLG I μL	Abs analítica	Concentración de Proteína $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	MED Conc. Proteína $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
1A	595	1	0.0196	1.1279	1.505
1A	595	1	0.0314	1.8098	
3A	595	1	0.0168	0.9689	1.2692
3A	595	1	0.0272	1.5695	
1B	595	1	0.0342	1.9715	1.9352
1B	595	1	0.0329	1.8988	
3B	595	1	0.0311	1.7923	1.8920
3B	595	1	0.0345	1.9917	

De los resultados obtenidos se obtuvieron los promedios para cada muestra. Cada promedio se utilizó para determinar las cantidades utilizadas en el proceso electroforético.

Electroforesis SDS-PAGE

Para correr las muestras en el proceso de electroforesis se cargaron 15 μL de muestra 1A y 15 μL de 1B más 15 μL de amortiguador para cada una. Las muestras 3A y 3B no se corrieron.

A partir de la técnica de electroforesis SDS-PAGE se obtuvo un patrón en el que se distinguen claramente diferentes bandas correspondientes a un frente molecular representativo. Estas bandas se compararon con el patrón característico de la Figura 15 y con los resultados reportados por J.M Syngelin (Figura 16A).

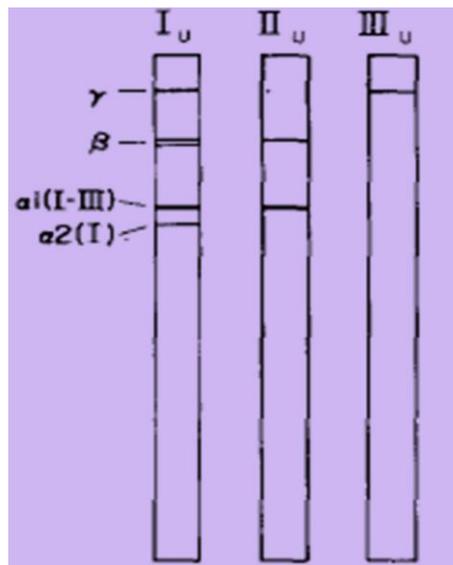


Figura 15. Patrón de bandas electroforéticas correspondiente a colágena TI,TII,TIII sin reducir.[104]

En la Figura 15 se indican las bandas correspondientes al heterotrímero que consta de 2 cadenas monoméricas α_1 idénticas y una cadena α_2 [$\alpha_1(\text{I})_2\alpha_2(\text{I})$]. Este heterotrímero es característico de la colágena tipo I y aparecen aproximadamente en las posiciones de 115 kDa y 96 kDa indicadas en el marcador de peso molecular de la Figura 16A. De

igual manera, se señalan las especies moleculares: una banda γ -trímero en aproximadamente 210 kDa y dos bandas de β -dímero en alrededor de 198 kDa. [107]

Haciendo un análisis cualitativo se pueden identificar de manera visual las posiciones de las bandas correspondientes a los patrones de las muestras A1 y B1. Se observa una correspondencia entre las bandas obtenidas y las indicadas en los patrones característicos de la colágena tipo I, con lo que se puede inferir la presencia de la proteína con nivel de pureza aceptable (Figura 17).

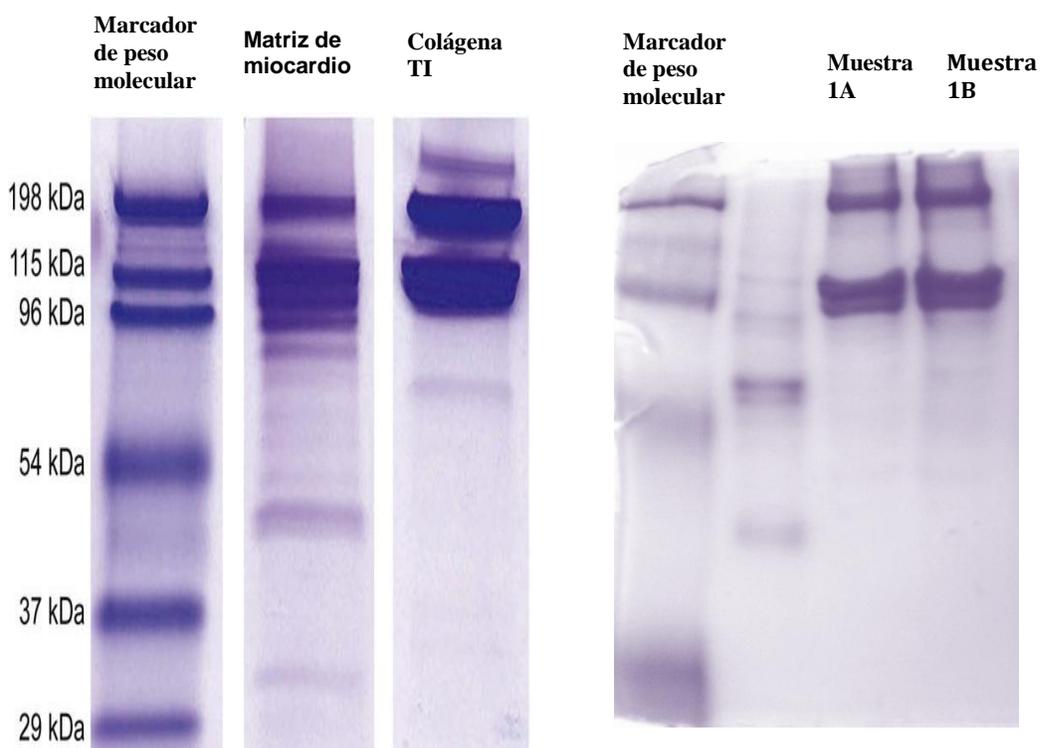


Figura 16. A) Patrón de bandas electroforéticas de Matriz de miocardio y CLG I [107] B) Patrón de bandas obtenido de las muestras 1A y 1B en presencia de un marcador Caleidoscopio

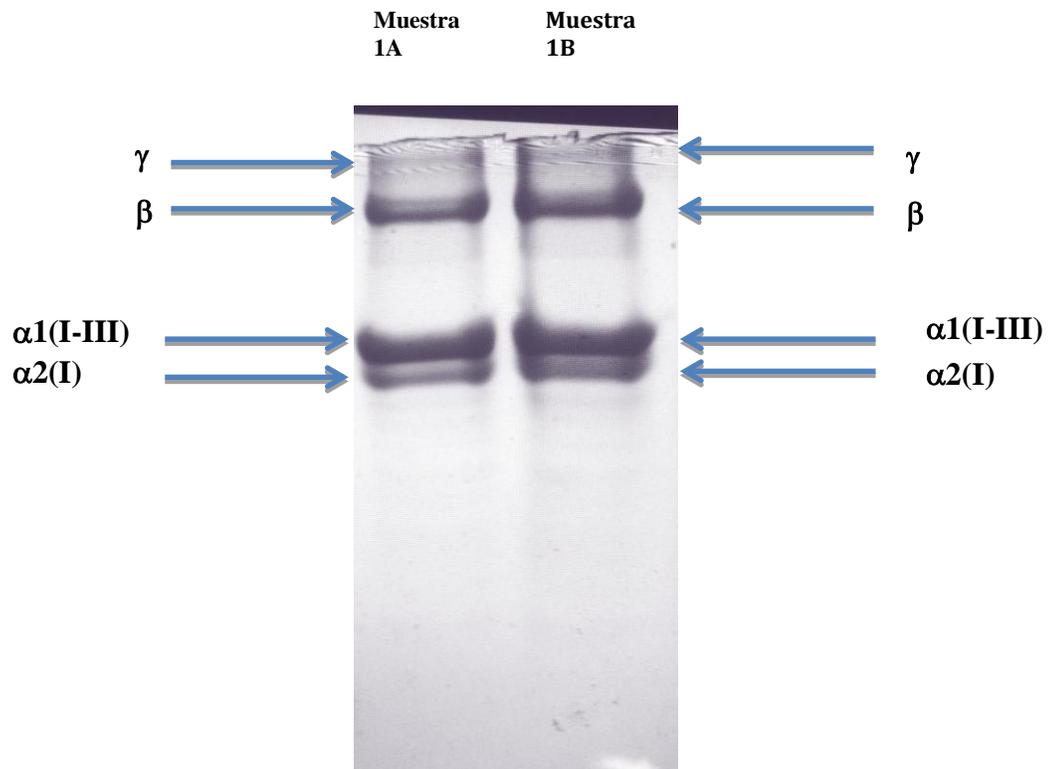


Figura 17. Patrón de las muestras A1 (izquierda) y B1 (derecha) con identificación de bandas.

Microscopía Electrónica de Barrido

Durante el procedimiento para establecer las condiciones idóneas para electrohilado se obtuvieron microfotografías por microscopía electrónica para analizar la morfología de cada formulación electrohilada. De esta manera se fueron modificando las variables hasta observar fibras continuas y homogéneas.

Previo a la mezcla de componentes se obtuvieron imágenes microscópicas de cada uno para observar los cambios en la morfología antes y después de la mezcla.

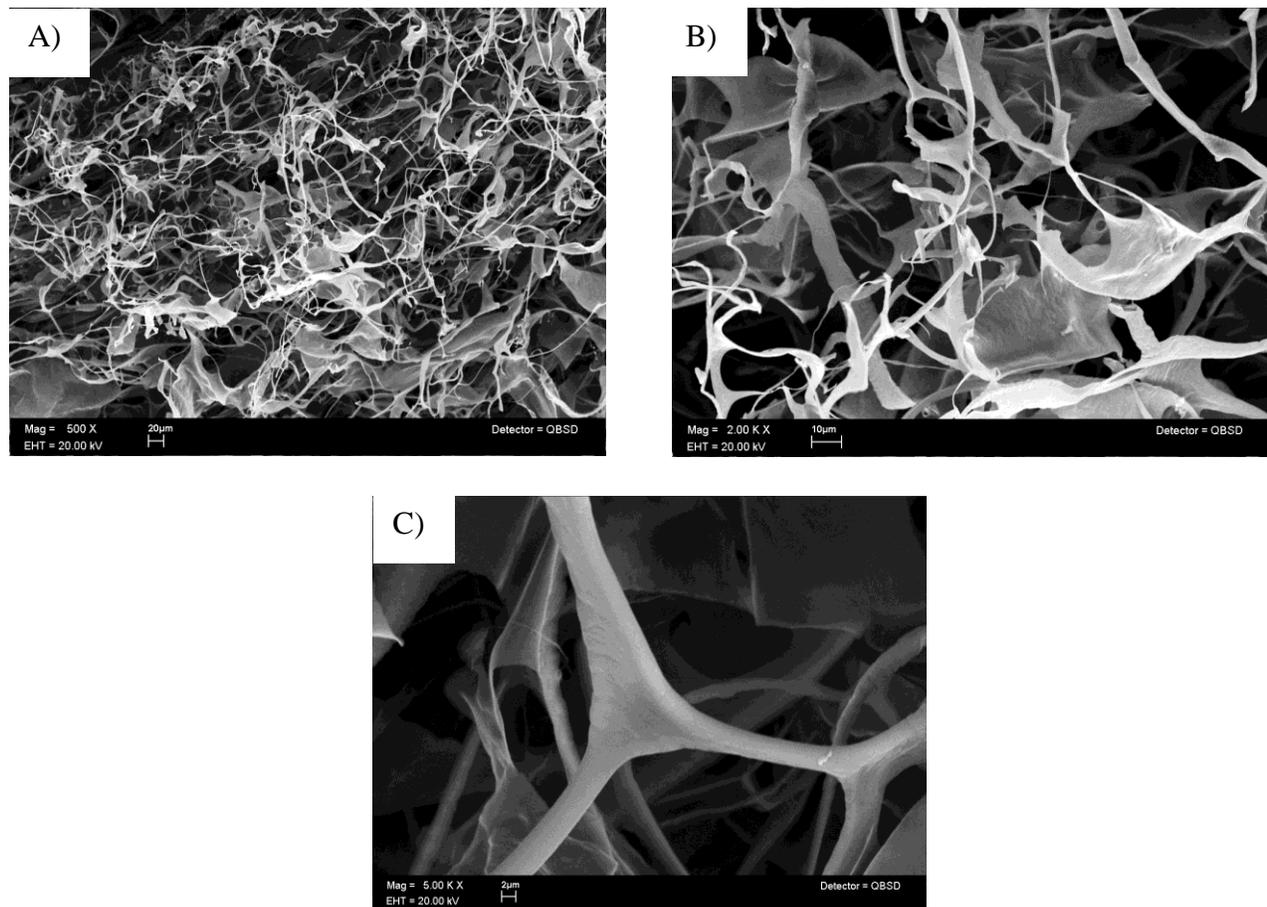


Figura 18. Muestras de colágena tipo I liofilizada. A) aumento 500X, B) aumento 2kX, C) aumento 5kX.

La colágena tipo I (CLG I) obtenida se liofilizó y analizó en *SEM* (Figura 18). Se observaron diferentes ramificaciones aleatorias con formaciones fibrosas de $1\ \mu\text{m}$ a $5\ \mu\text{m}$. En la Figura 18 B se observan pequeñas láminas que se pueden atribuir a conjuntos de fibras adheridas durante la liofilización.

De igual forma se analizó la polivinilpirrolidona liofilizada, observándose dos tipos de formaciones. Por un lado una superficie continua con poros de diámetro variable entre 1 y $10\ \mu\text{m}$. Estas formaciones se pudieron originar por la acción de sublimación del agua contenida en la solución polimérica (Figura 19.A y 19.B).

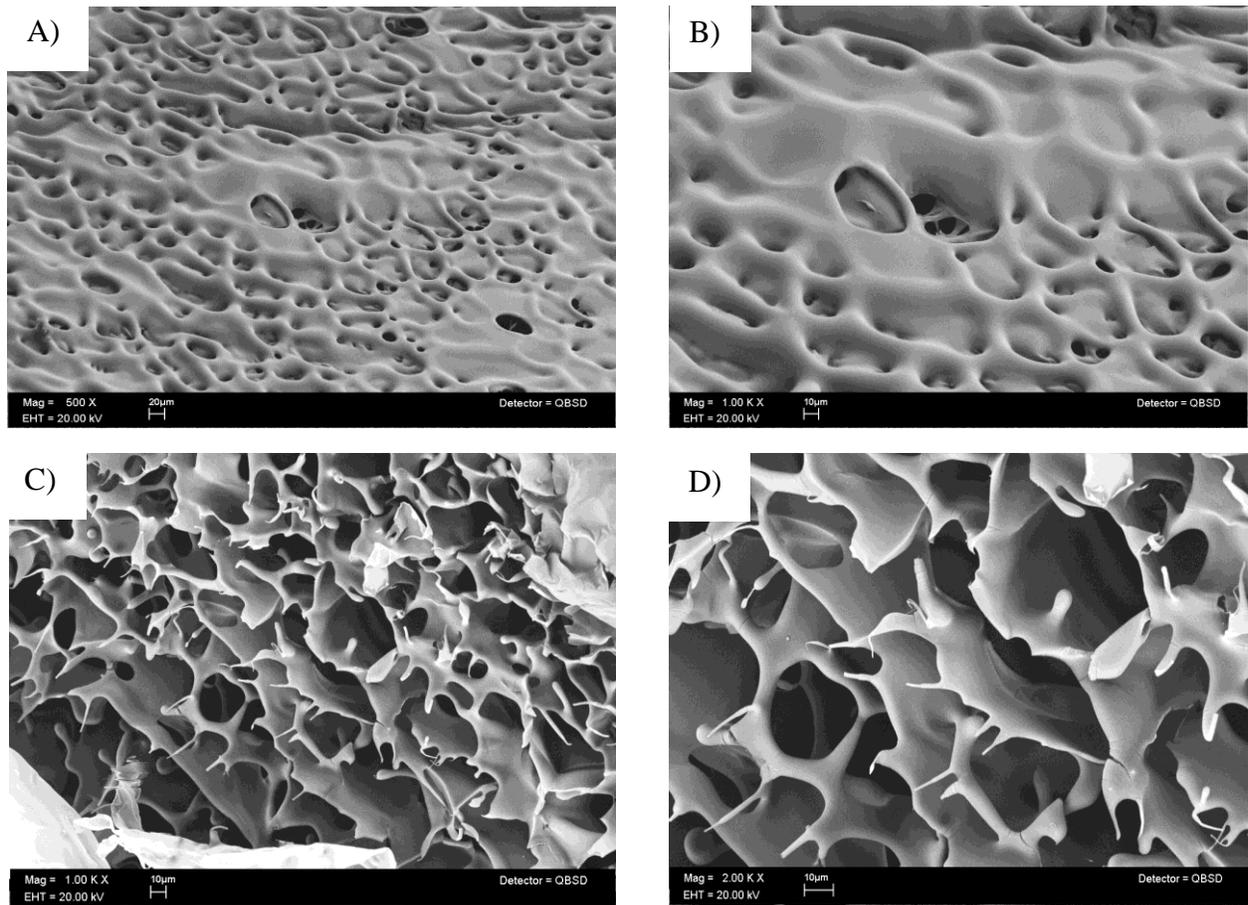


Figura 19. A) PVP aumento 500X estructura superior, B) PVP aumento 1KX estructura superior, C) PVP aumento 1K X formaciones posteriores, D) PVP aumento 2KX formaciones interiores.

En las figura 19.C y 19.D se muestra otra estructura formada en las muestras de PVP. Esta presenta una distribución aleatoria de paredes con poros aparentemente interconectados. La superficie irregular de estas imágenes corresponde a la parte interior de la muestra de PVP. Esto se distingue en la Figura 20. Donde se puede observar en la parte superior derecha, la superficie continua (situada en el círculo azul) y en la parte inferior la morfología cancelosa, similar a la estructura de un panal. La formación de esta estructura muestra poros formados por las moléculas de agua que se sustrajeron al sublimarse durante el proceso de liofilizado.

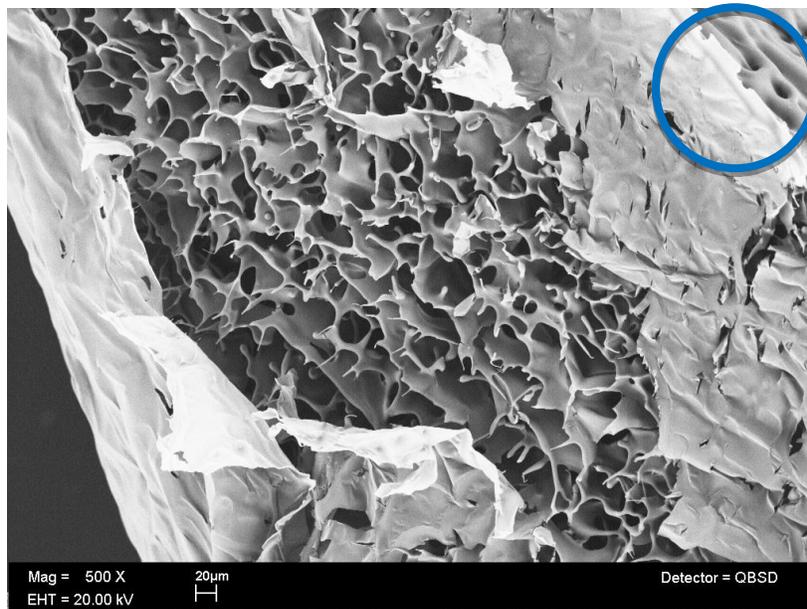


Figura 20. Imagen de polivinilpirrolidona con las dos formaciones estructurales presentes (aumento 500X).

Utilizando PVP-15K (Sigma Aldrich) y la CLG I se formó una mezcla física que posteriormente se expuso a radiación gamma. La mezcla se analizó antes y después de la irradiación obteniéndose imágenes en las que se distinguen morfologías diferentes que indican un cambio en la estructura química de la mezcla debido a una polimerización.

En la figura 21.A se observa una morfología muy similar a la de la figura 19.A correspondiente al PVP, sin embargo al incrementar la magnitud de la imagen se distinguen lo que pudiesen ser las fibras de colágena embebidas en la matriz de PVP, indicadas con las flechas rojas. (Figura 21.C).

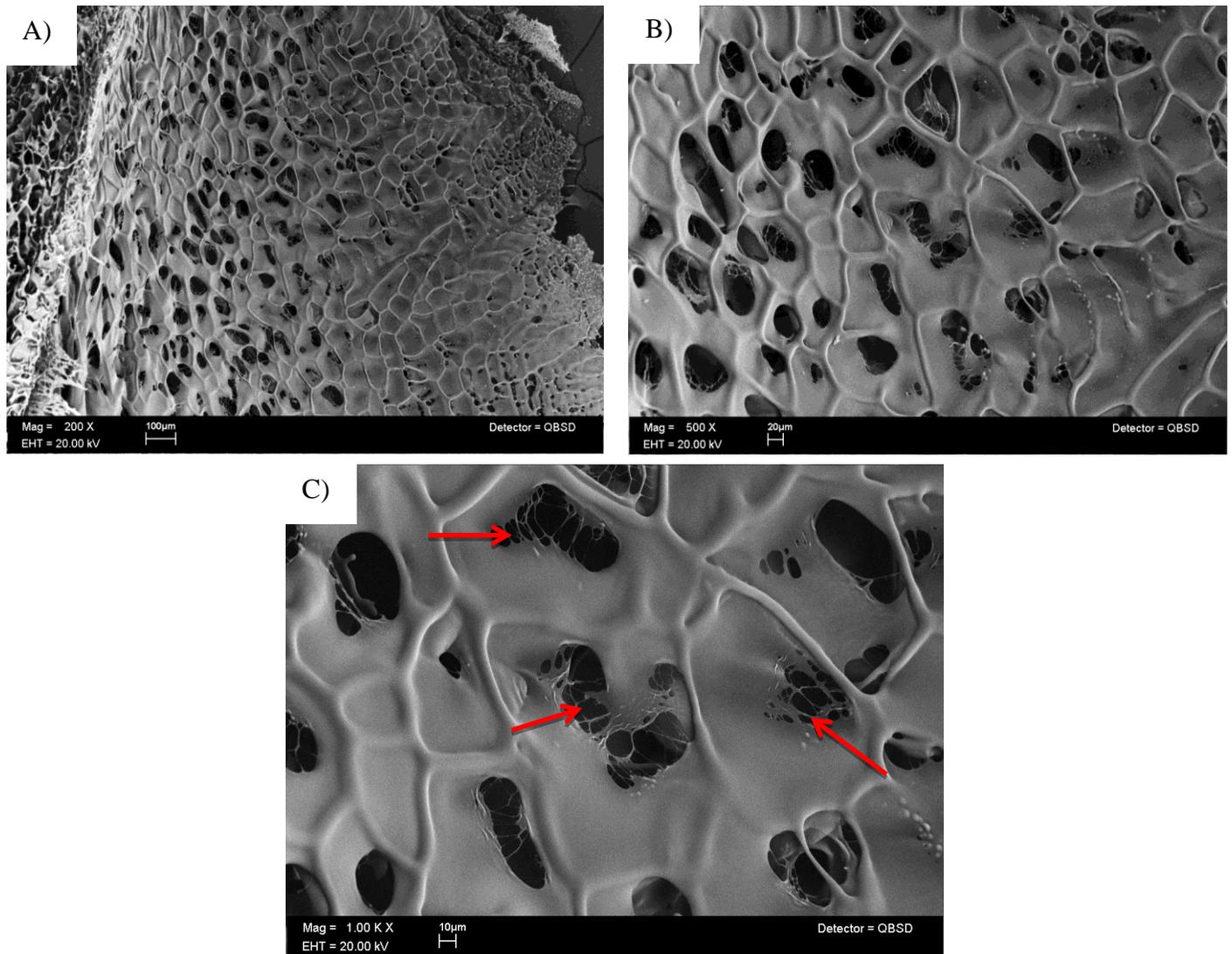


Figura 21. Mezcla física de PVP - CLG I. A) Aumento 200X, B) 500X, C) indicación de fibras de colágena a 1KX de aumento.

Al observar por *SEM*, las muestras de la mezcla PVP-CLG I irradiada se diferencia fácilmente de la morfología de la mezcla física sin exposición a rayos gamma.

En la figura 22.A se distingue una formación escamosa con terminaciones fibrosas señaladas en el círculo azul. Se observan elementos similares a membranas, dispuestas a lo largo de las fibras (figura 22.C y 22.D).

Con estos resultados se puede comprobar de manera visual, el efecto morfológico de la polimerización por radiación de la mezcla PVP-CLG I.

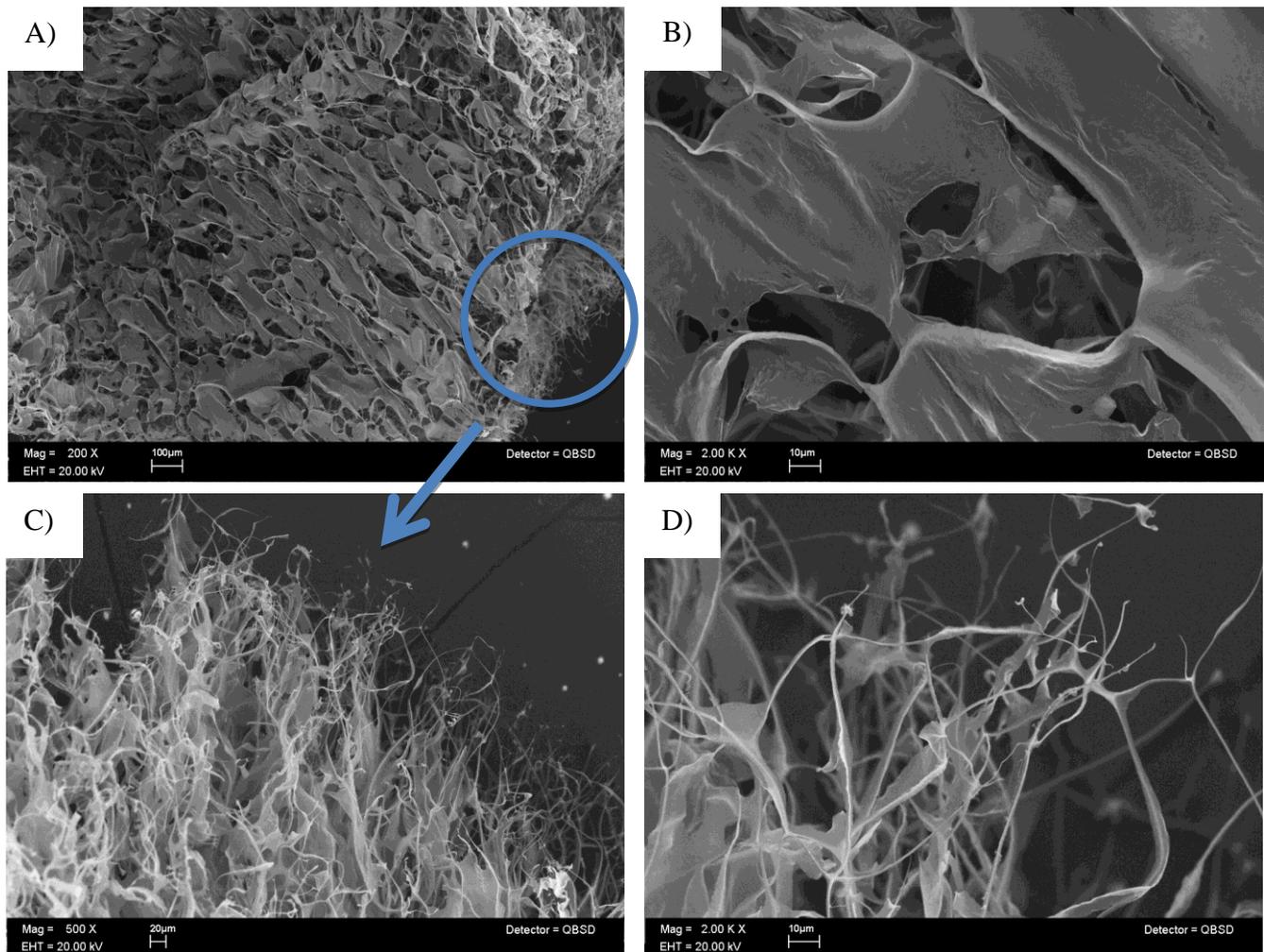


Figura 22. Mezcla de PVP-CLG I irradiada. A) Formación de escamas fibrosas 200X, B) formación de escamas fibrosas 2KX, C) terminaciones fibrosas de bordes de la muestra irradiada a 500X, D) detalle de los extremos de las fibras a 2 KX.

Los depósitos de las soluciones sobre las placas de aluminio durante el electrohilado se analizaron en cada etapa para establecer las condiciones en las cuales las fibras tuvieran formaciones homogéneas. Experimentando con las variables de la Tabla 2. Finalmente se eligió la concentración PCL 12% (Figura 23) con las condiciones de electrohilado: 15 kV, longitud entre placa colectora y aguja de 25cm y un caudal de 0.6 mL/h.

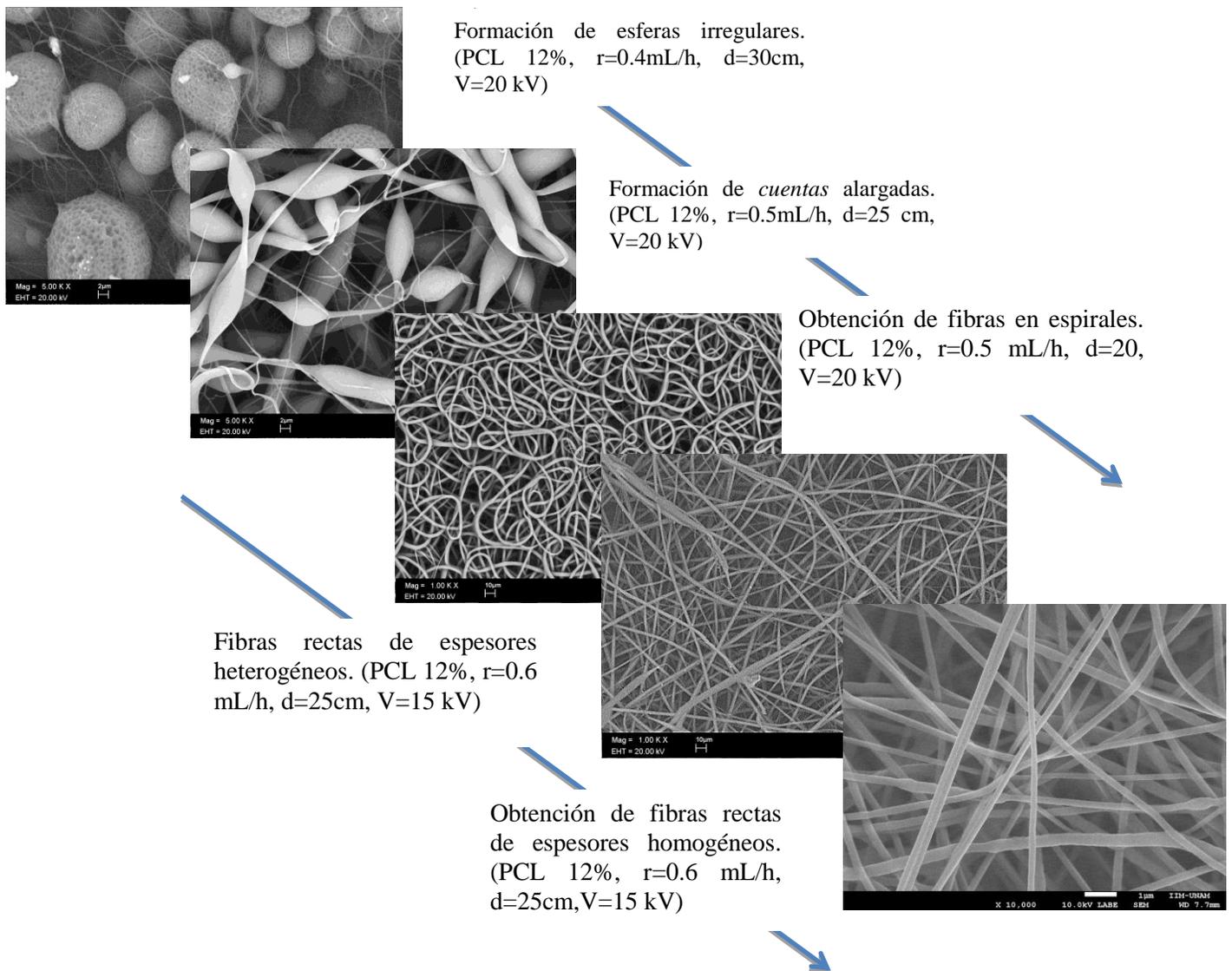


Figura 23. Evolución morfológica de depósitos de PCL alternando diferentes variables.

La mezcla PVP-CLG I que fue irradiada se identificó como FQL y se adicionó a una solución de PCL 12% en Trifluoroetanol.

Las tres soluciones indicadas en la Tabla 3 se electrohilaron bajo condiciones ambientales similares y con las variables establecidas. Las matrices obtenidas se analizaron por *SEM*. Con esto se pudo identificar el efecto de los adiconantes sobre el PCL.

En la Figura 24 se comparan las tres formulaciones. En las imágenes se identifican fibras encontradas en las formulaciones de PCL-CLG I y PCL-FQL.

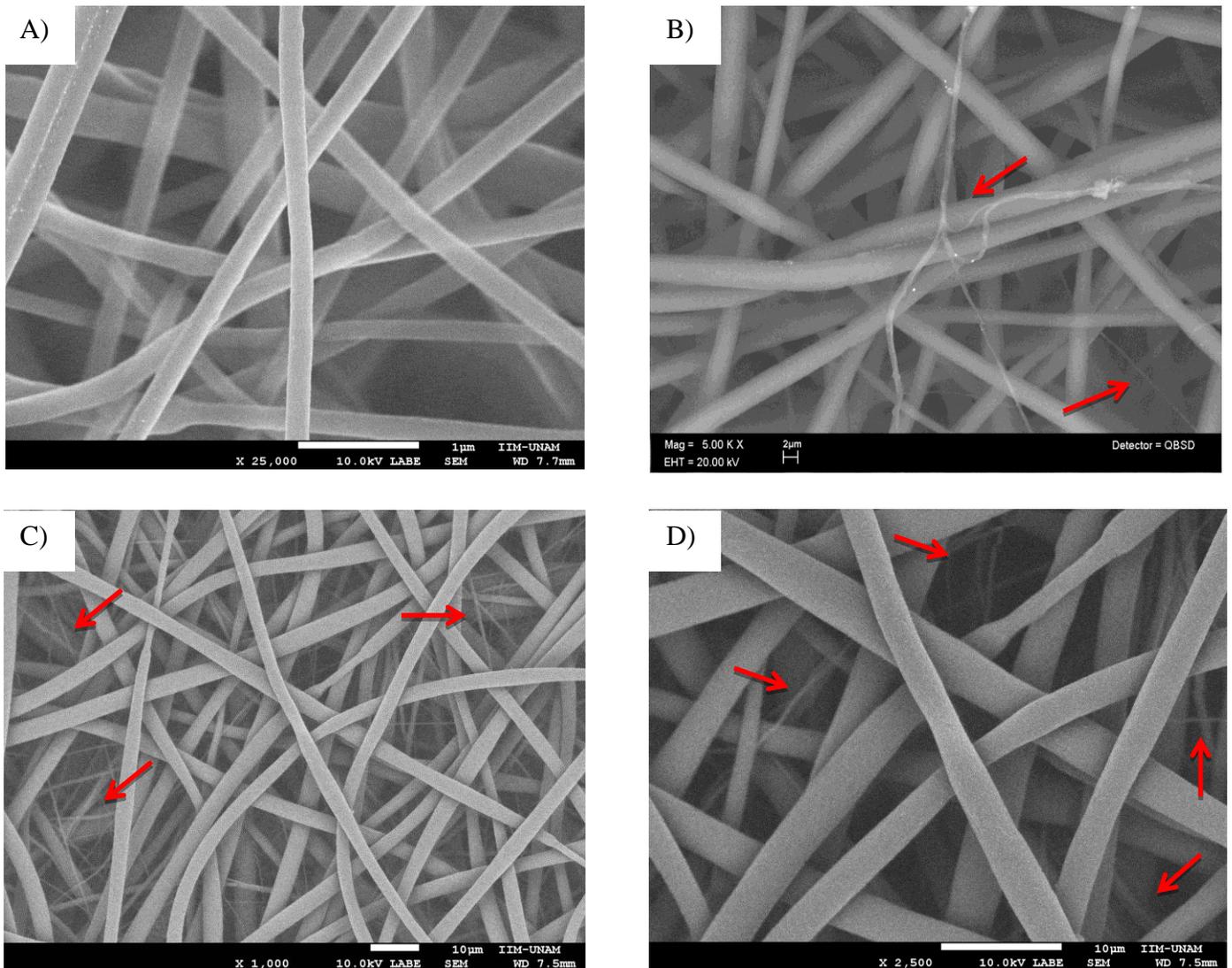


Figura 24. Micrografías de las matrices porosas. A) Fibras de PCL 25 KX, B) Fibras de PCL-CLG I 5KX, C) electrohilado de matrices PCL-FQL 1kX, D) detalle de interfibras de PCL-FQL 2.5 KX.

Se puede observar en la Figura 24.A las fibras hiladas de PCL, estas se encuentran dispuestas aleatoriamente y tienen un espesor casi homogéneo 250 nm. Como era de esperar, no se distinguen otras formaciones fibrosas.

La Figura 24.B corresponde a la matriz hilada de PCL-CLG I. En esta se distinguen pequeñas cantidades de fibras distintas a la mayoría presentes en la muestra. La mayor cantidad de fibras, de espesores aproximados de 2 μm corresponde a PCL y las fibras señaladas con rojo sugieren formaciones de colágena. En la matriz electrohilada de

PCL-FQL se observan, a diferencia del PCL-CLG I, una mayor cantidad de fibras de dos tipos, la correspondiente a PCL (espesor aproximado de 3 μm) en mayor proporción y en menor cantidad, señaladas con rojo en la figuras 24.C y 24.D, las atribuibles al copolímero FQL. Estas últimas presentan un espesor aproximado de 1 μm y se observan dispuestas entre las fibras de PCL.

Análisis de matrices por TGA y DSC.

Las matrices electrohiladas fueron estudiadas con las técnicas de TGA y DSC, para analizar fusión, evaporación, o reacciones químicas como hidrólisis y oxidación, como una función del tiempo y de la temperatura. [108]

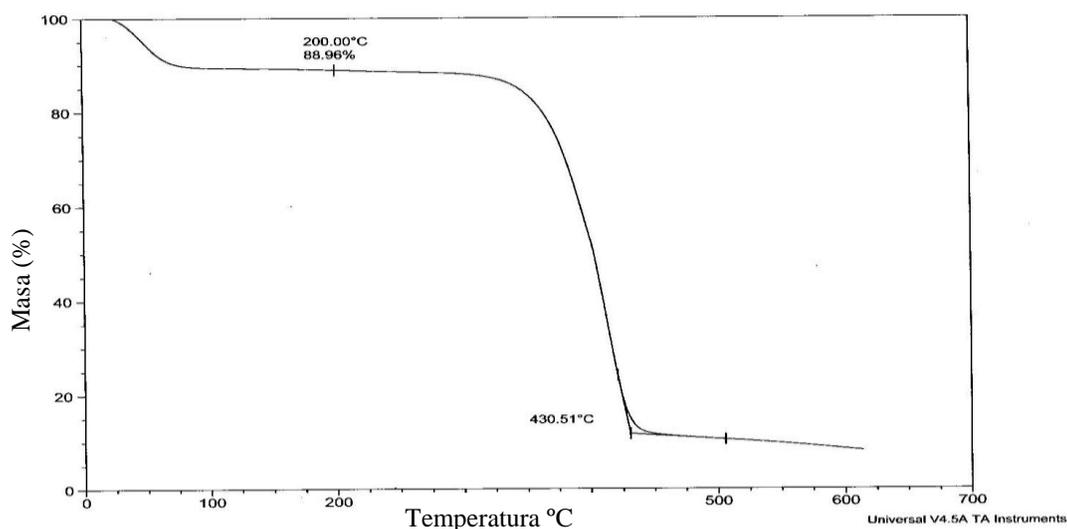


Figura 25. Diagrama TGA de PVP

Se analizaron los precursores de las mezclas por TGA a una velocidad de calentamiento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ en un rango de 25 $^{\circ}\text{C}$ a 500 $^{\circ}\text{C}$. Para la muestra de PVP (Figura 25) se observa una disminución de masa de temperatura ambiente a aproximadamente 80 $^{\circ}\text{C}$ atribuida a la pérdida de agua, seguido de una meseta hasta los 300 $^{\circ}\text{C}$ donde inicia su descomposición. La muestra de colágena (Figura 26) presenta una disminución de masa, en una primera etapa hasta los 166 $^{\circ}\text{C}$. Etapa en la cual se pierde masa atribuida a la evaporación de agua residual. Posteriormente hay una pérdida debido a las moléculas de agua restringidas por las interacciones hidrófilas de la colágena y el grupo

hidróxilo hasta los 248 °C. Donde inicia la descomposición de las moléculas de colágena. [109].

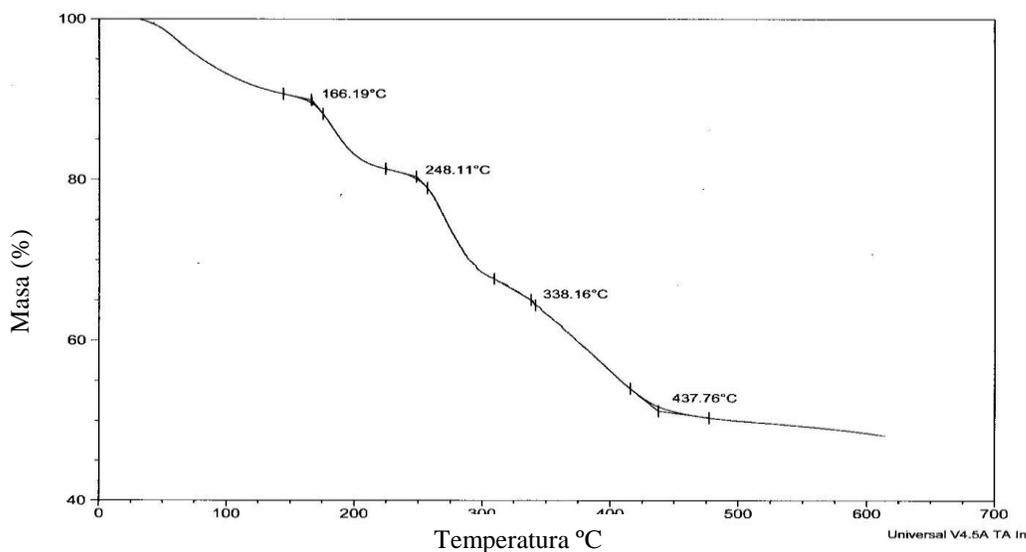


Figura 26. Diagrama TGA de CLG I

En la Figura 27 se muestra el TGA de mezcla irradiada de PVP-CLG I. En esta se observa la pérdida de masa correspondiente a agua débilmente unida hasta 100 °C y una pequeña disminución hasta los 153°C atribuida al agua adsorbida por la mezcla, seguida de la pérdida del grupo hidroxilo de la colágena hasta 269 °C. para iniciar la descomposición de la mezcla.

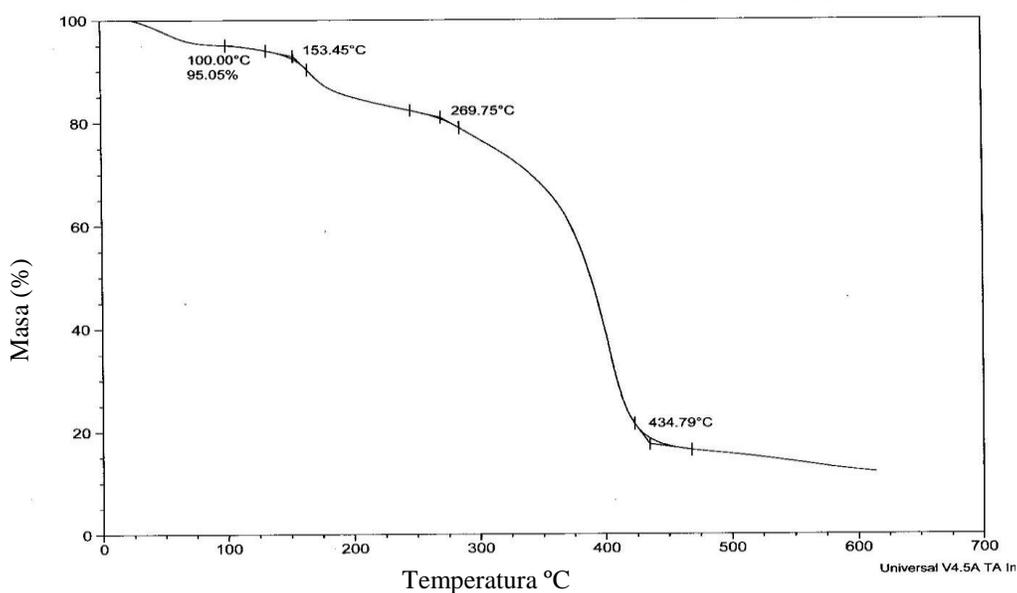


Figura 27. Diagrama TGA de FQL, 0°C a 500°C.

En la Figura 28 se muestra el diagrama TGA de las matrices de PCL. En este no se observa una pérdida de masa relacionada con agua. Esto indica que el porcentaje de humedad en la muestra es muy baja. La degradación del material comienza a aproximadamente 320°C seguida de la combustión del polímero cerca de los 411°C.

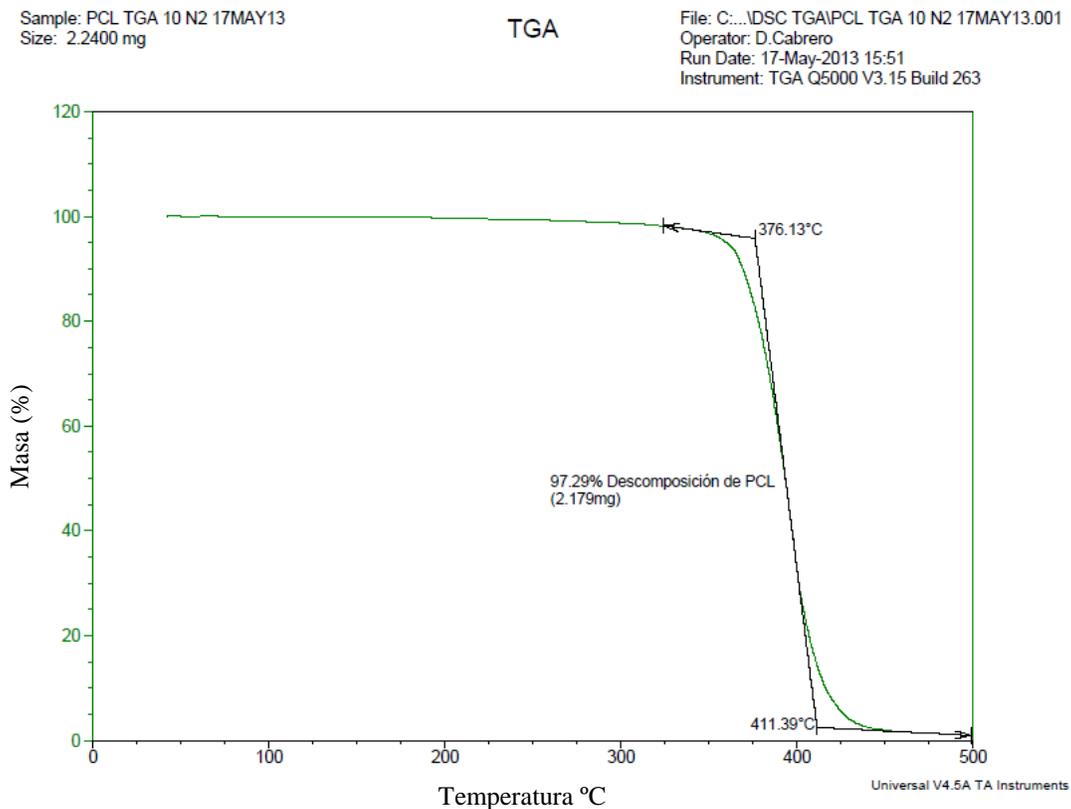


Figura 28. Diagrama TGA para la matriz de PCL 0°C a 500°C

En la figura 29 se cotejan las curvas termogravimétricas de PCL, PCL-CLG I y PCL-FQL en conjunto. En éste diagrama no se observa una diferencia significativa entre curvas. No obstante las pequeñas diferencias indican la presencia y el porcentaje relativo a los componentes de la mezcla. La línea continua en azul corresponde a la muestra de PCL, esta presenta las mismas características ya mencionadas. La línea discontinua en el gráfico pertenece a la matriz de PCL-FQL. Ésta prácticamente se sobrepone a la de PCL, sin embargo se puede notar ligeramente un retraso durante el inicio de la descomposición del copolímero, entre 330 y 370°C (indicado en el círculo azul), así

como en la zona de combustión de los componentes aproximadamente en 410°C. Lo cual indica el bajo contenido de FQL en la mezcla.

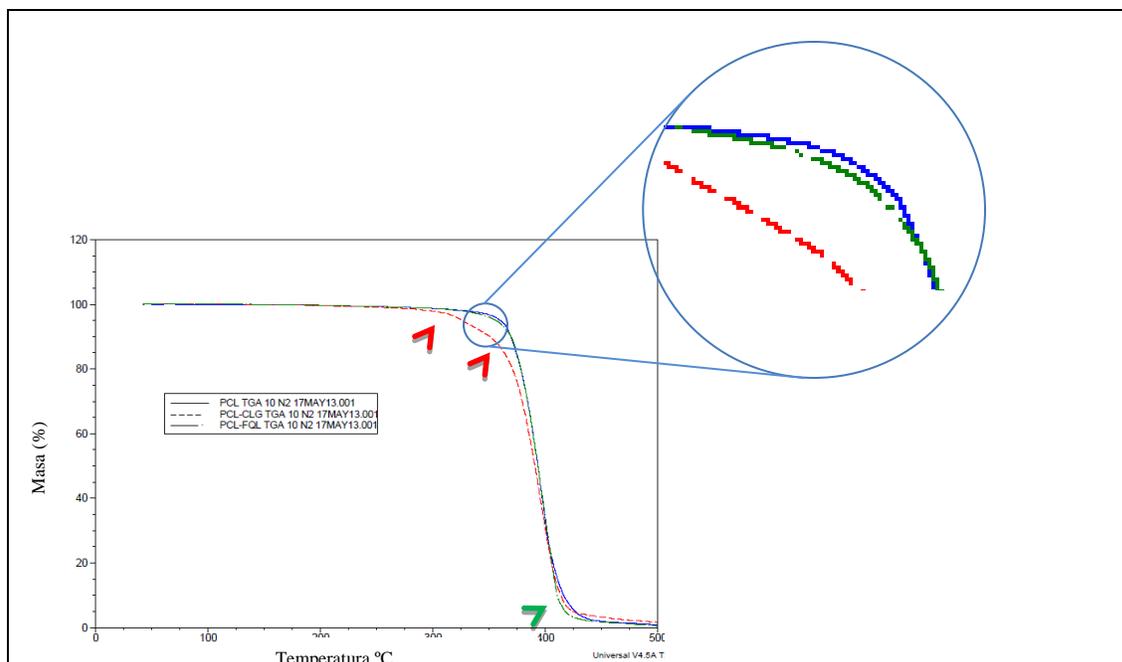


Figura 29. TGA de los tres tipos de matrices electrohiladas: PCL, PCL-CLG I y PCL_FQL 0°C a 500°C.

Se indica con marcadores rojos la variación durante el inicio de la descomposición de PCL-CLG I (Línea punteada roja) respecto a la curva de PCL. Dado el escueto porcentaje de CLG I en esta matriz se observa en la Figura 29 dos mínimas variaciones en 300°C y 350°C respecto a PCL, como la parte final de pérdida de grupos hidroxilos e inicio de la descomposición de la CLG I respectivamente.

La Figura 30 muestra la comparación de las curvas de DSC de las tres formulaciones. Se observa una depresión en aproximadamente 10°C. Esta depresión es menos pronunciada para el PCL con adicicionantes conforme se acerca al pico endotérmico (T_m). La zona entre 0 a 50°C indica una mayor absorción de energía por la muestra *pura* de PCL (azul). Las tres muestras convergen aparentemente hacia un punto, sin embargo al hacer un acercamiento al pico endotérmico se observa un menor punto de fusión de las muestras con adicicionantes relativo al PCL.

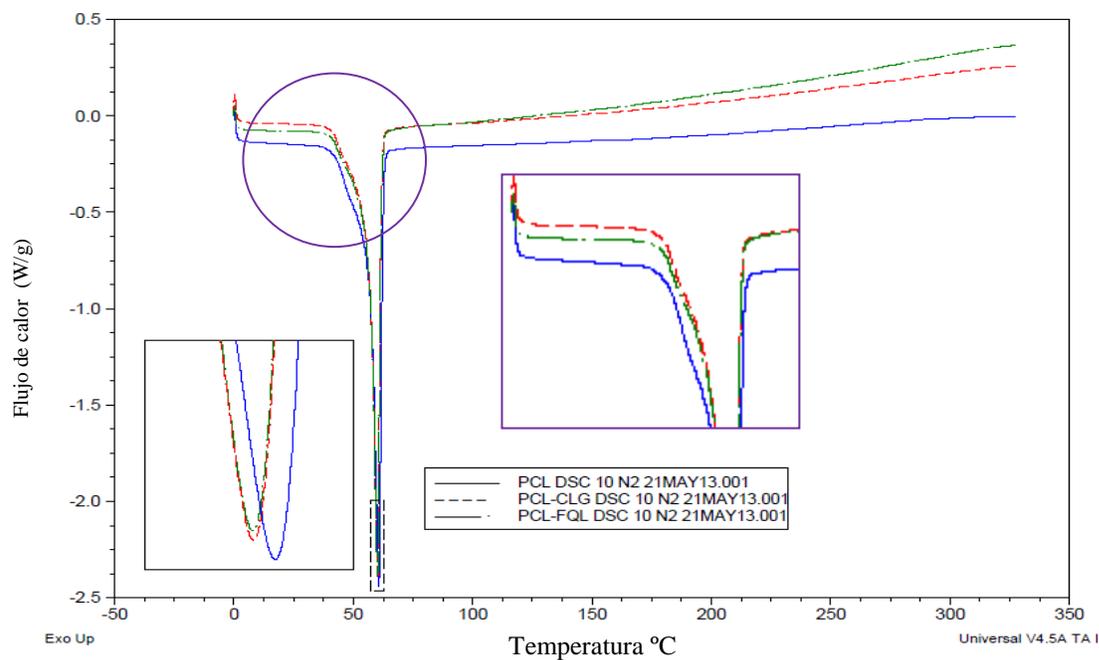


Figura 30. Diagrama DSC para las matrices electrohiladas: PCL, PCL-CLGI y PCL-FQL 0°C a 350°C.

Análisis por Espectroscopia de Infrarrojo

Para observar el comportamiento de los grupos funcionales las muestras electrohiladas se analizaron por FTIR.

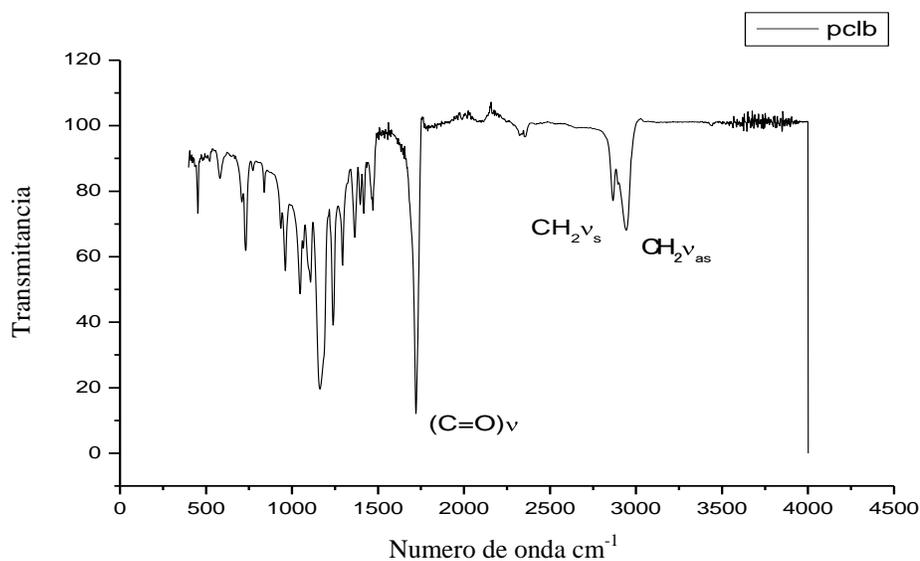


Figura 31. Espectro FTIR de PCL indicando las principales bandas de los grupos funcionales.

En la Figura 31 se observa una banda a 2944 y 2865 cm^{-1} relacionados con la vibración en tensión de los enlaces $-\text{C}-\text{H}$. Se indica un pico a 1720 cm^{-1} correspondiente al enlace carbonilo $-\text{C}=\text{O}$ de la unión éster de la policaprolactona. A 1238 cm^{-1} se encuentra el pico asignado a la vibración de estiramiento a tensión asimétrico del $-\text{COC}$ y a 1164 en estiramiento simétrico. Las bandas mencionadas se enlistan en la tabla 6.

Tabla 6. Principales bandas en el espectro *FTIR* de PCL

Tipo de Enlace	Valor experimental. No. De Onda (cm^{-1})
Estiramiento $-\text{CH}_2$ asimétrico	2944
Estiramiento $-\text{CH}_2$ simétrico	2865
Estiramiento tensión $-\text{C}=\text{O}$ carbonilo	1720
Estiramiento COC asimétrico	1238
Estiramiento COC simétrico	1164

El espectro IR de la colágena tipo I purificada se muestra en la Figura 32. En esta se observan los principales picos que presenta esta proteína. Se indican las bandas: Amida I a 1641 cm^{-1} ($-\text{C}=\text{O}$), Amida II en 1571 cm^{-1} ($\text{N}-\text{H}$), Amida III a una longitud de 1247 cm^{-1} . Se evidencian a las bandas correspondientes a las amidas A y B en 3309 y 2019 cm^{-1} respectivamente. [110-112]

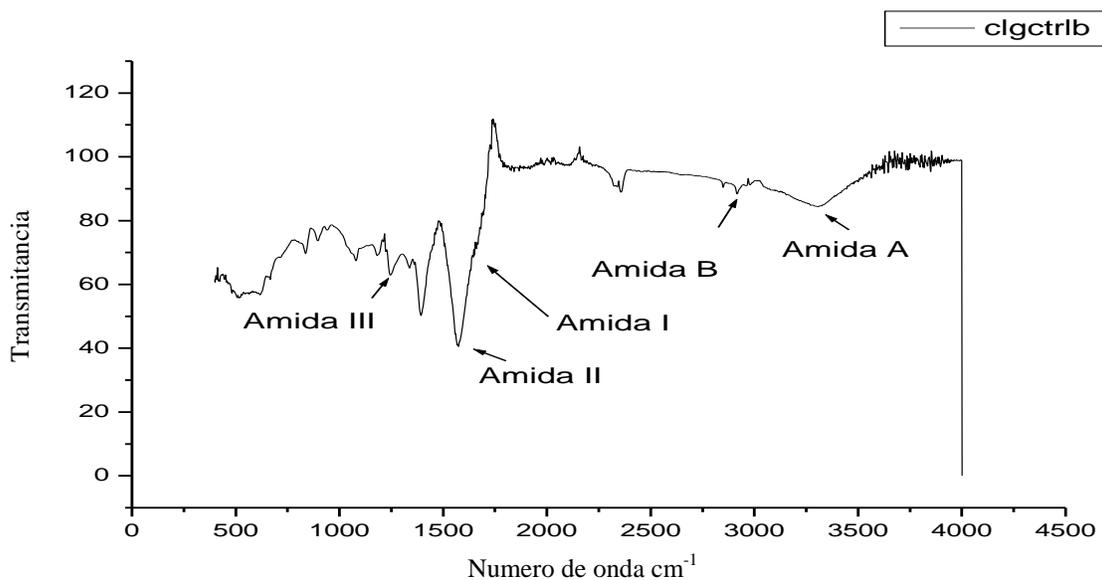


Figura 32. Espectro *FTIR* de la colágena tipo I purificada, indicación de grupos amidas.

Las bandas principales de la colágena obtenida se enlistan en la tabla 7.

Tabla 7. Principales bandas en el espectro *FTIR* de CLG I

Tipo de Enlace	Valor experimental. No. De Onda (cm ⁻¹)
Amida A (O-H) estiramiento a tensión	3309
Amida B Estiramiento asimétrico	2919
Amida I (C=O) Estiramiento	1641
Amida II (-N-H) Flexión y estiramiento de (-N-C)	1571
Amida III (-N-H) flexión	1247

Otro precursor al que se le realizó ensayo de *FTIR* fue el PVP. Este presentó las siguientes bandas típicas: en 1444 cm⁻¹ y 1282cm⁻¹ se observan bandas atribuibles a vibraciones de flexión del grupo C-H y estiramiento de C-N, en 1661cm⁻¹ se indican picos correspondientes a vibraciones del grupo C=O. Se evidencian bandas a 2900cm⁻¹ y 1650 cm⁻¹ aplicables a las vibraciones de tensión del grupo C-H. (Figura 33). De igual forma se observa una banda ancha en 3400 cm⁻¹ correspondiente a presencia de agua absorbida debido a la hidrofiliidad del polímero.

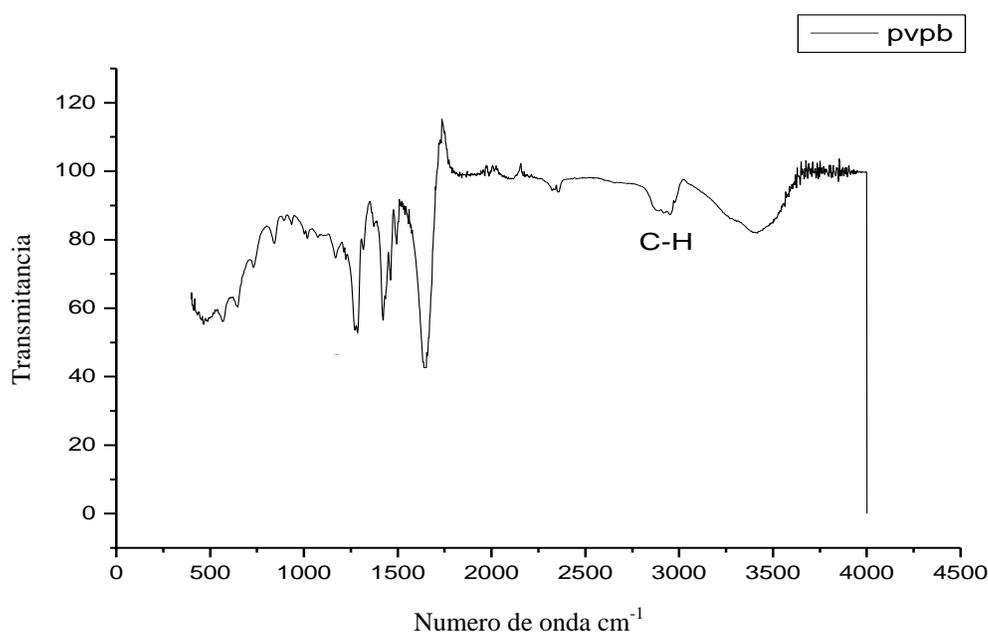


Figura 33. Principales bandas del espectro *FTIR* para PVP.

Con el fin de corroborar la presencia de los grupos funcionales del PVP y CLG I en el copolímero FQL. Se obtuvo el espectro *FTIR* correspondiente (Figura 34). En este se observa principalmente la contribución de la señal de la Amida A de CLG I (rojo) en 3309 cm^{-1} y el agua presente en la señal del PVP (azul) en 3400 cm^{-1} , aumentando el ancho por suma de bandas en el FQL (circulo azul). Así como la contribución de la Amida I y II de CLG I (1641 cm^{-1} y 1571 cm^{-1} respectivamente) con el grupo carbonilo C=O 1661 cm^{-1} indicado en el diagrama del FQL.

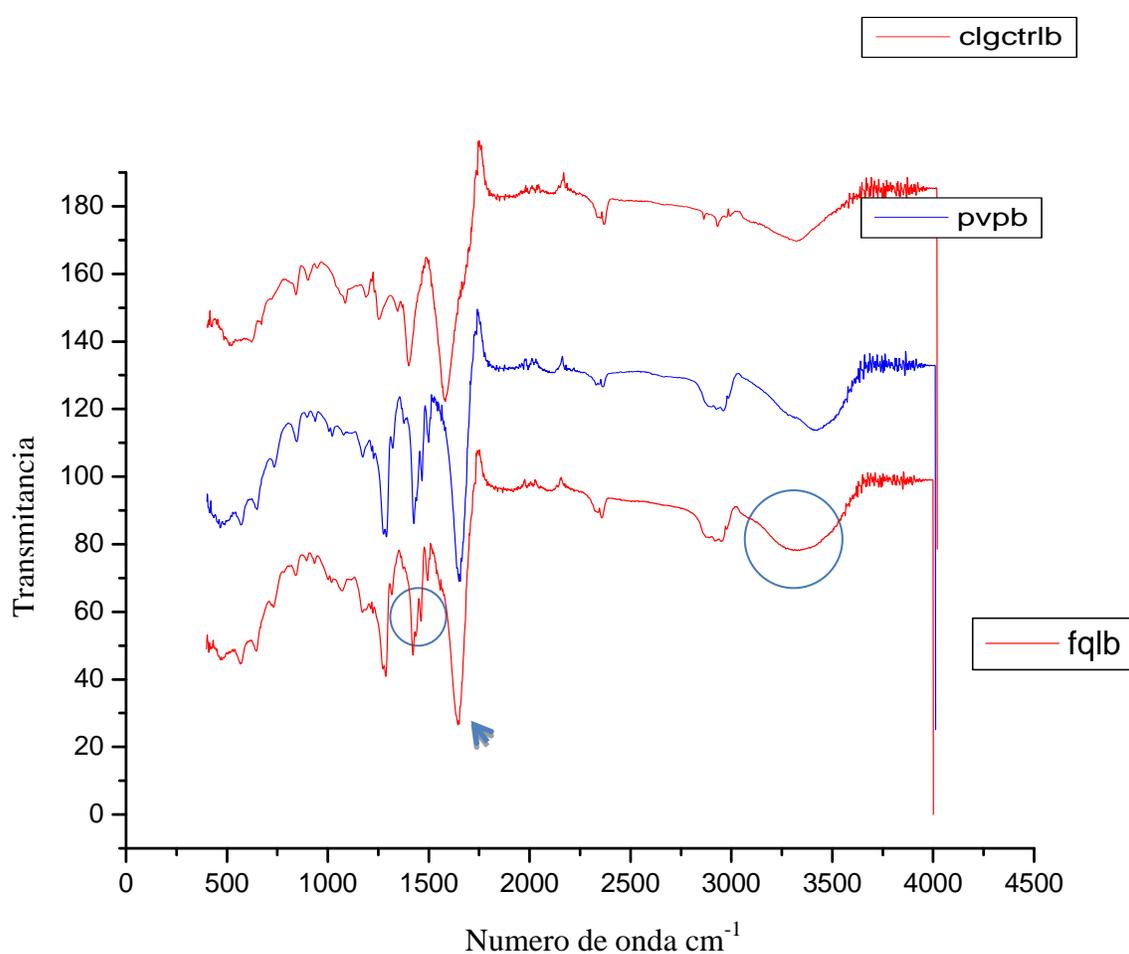


Figura 34. Comparación de los espectros FTIR de CLG I (rojo), PVP (azul) y FQL (negro).

De igual forma se compararon de manera simultánea los espectros de *FTIR* de las matrices electrohiladas de PCL, PCL-CLG I y PCL-FQL (Figura 35). Al analizar los tres espectros se observan picos prácticamente coincidentes. Los espectros de las matrices con adicicionantes, PCL-CLG I y PCL-FQL, evidencian una similitud al espectro PCL, excepto, y de manera muy sutil, en la zona de 3000 cm^{-1} a 3600 cm^{-1} , donde se nota una señal ancha con muy poca intensidad (marcadores verdes). Con posible atribución a las bandas de la amida A en 3309 cm^{-1} y del grupo carbonilo OH en 3400 cm^{-1} señalados en las figuras 29 y 30 respectivamente. Es posible que las señales correspondientes a los adicicionantes CLG I y FQL en el espectro, no sean perceptibles dada la escasa concentración de estos sobre el PCL. Así las bandas del componente que se encuentra en una proporción mucho mayor podrían sobreponerse a las señales de los demás compuestos presentes.

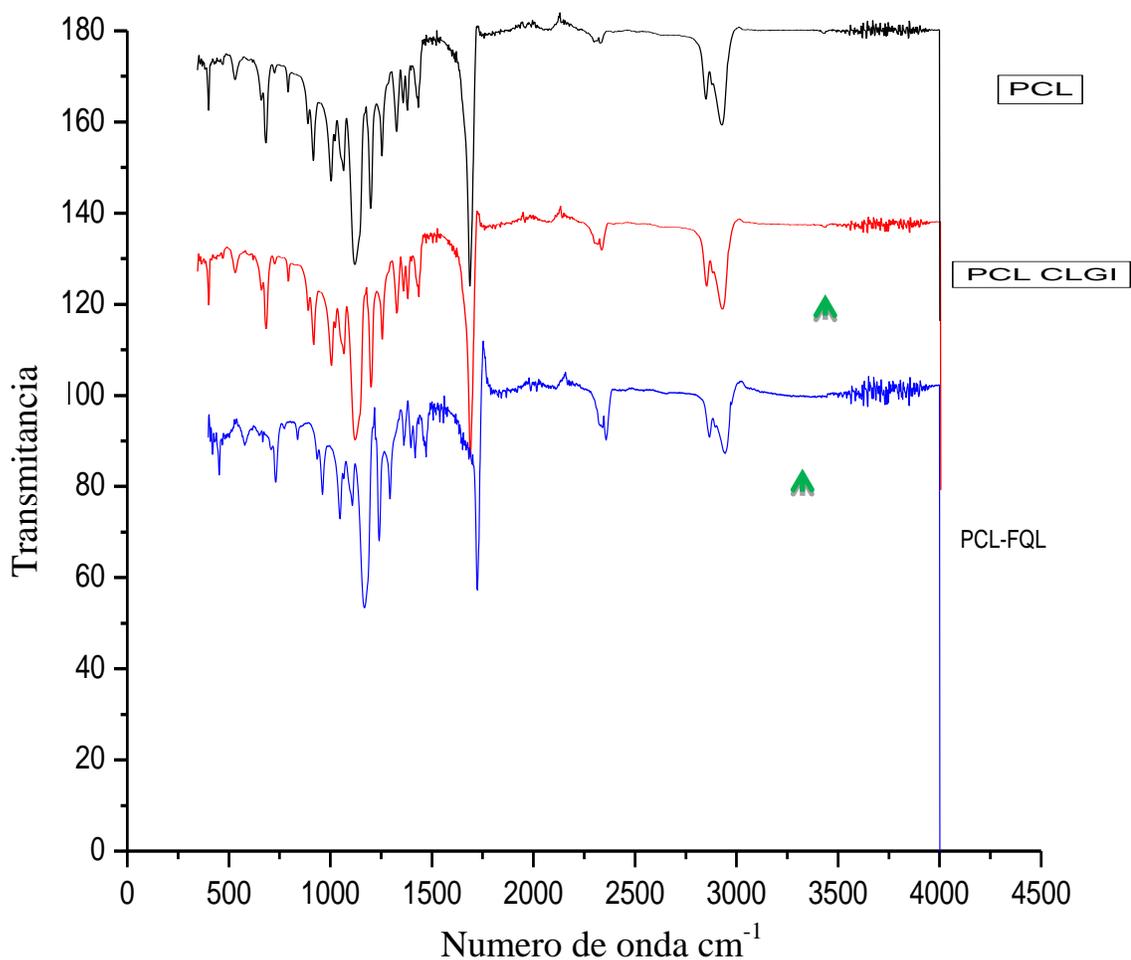


Figura 35. Espectros FTIR de las matrices PCL, PCL-CLG I y PCL-FQL.

Análisis de los Ensayos de tensión.

Los tres tipos de matrices electrohiladas se ensayaron mediante pruebas de tensión. A través de éstas se obtuvieron sus correspondientes gráficas de esfuerzo deformación, con las se analizó el comportamiento de las matrices de PCL al mezclarlo con CLG I y FQL apoyándose en los parámetros mecánicos: módulo elástico, deformación, esfuerzo a la falla y esfuerzo máximo. También se ubicaron los límites elástico y de fluencia.

En la Figura 36. se muestra el comportamiento mecánico del PCL en tres zonas definidas como: zona elástica (A), zona plástica (B) y zona de escisión y fractura (C). Dado que es un polímero semicristalino, éste presenta un comportamiento similar al de los metales, esto es, muestra una etapa elástica seguida de una deformación plástica hasta su falla. Se observa para cada etapa la deformación de las probetas conforme progresa el ensayo.

Zona A: De esta zona se obtiene la constante de proporcionalidad entre la deformación elástica y el esfuerzo uniaxial, esto representa la pendiente de la parte recta de la gráfica esfuerzo-deformación. Esta constante llamada Módulo elástico se deduce por la línea recta marcada en el gráfico, con magnitud encontrada de $E=11.94$ MPa. Este valor se encuentra por debajo del rango reportado en la literatura marcado entre 35 MPa a 45 MPa [113]. Esto se debe principalmente a la porosidad del material y la disposición aleatoria de las fibras. En esta etapa las microfibras inician una alineación con respecto al esfuerzo aplicado al inicio de la carga, dando lugar a un “pie de curva” indicada en el círculo azul. De manera continua, el esfuerzo se trasmite directamente al arreglo molecular del polímero, en donde las zonas amorfas de la estructura polimérica se extienden unidireccionalmente, generando la zona elástica hasta el límite de proporcionalidad σ_p , por encima del cual se provoca el reacomodo de los segmentos cristalinos, para obtener una estructura altamente orientada. Cuando el esfuerzo excede éste límite, el polímero experimenta deformaciones residuales hasta iniciar las desplazamientos de los segmentos cristalinos en el punto de fluencia σ_y .

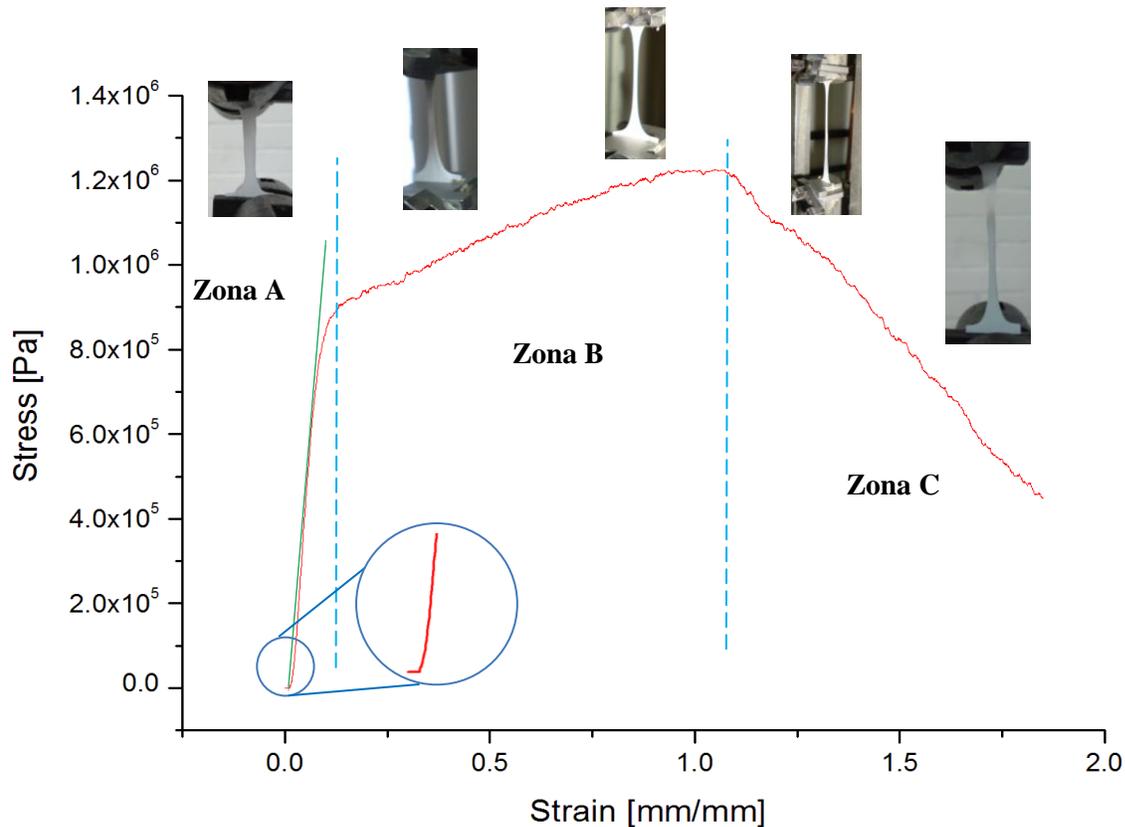
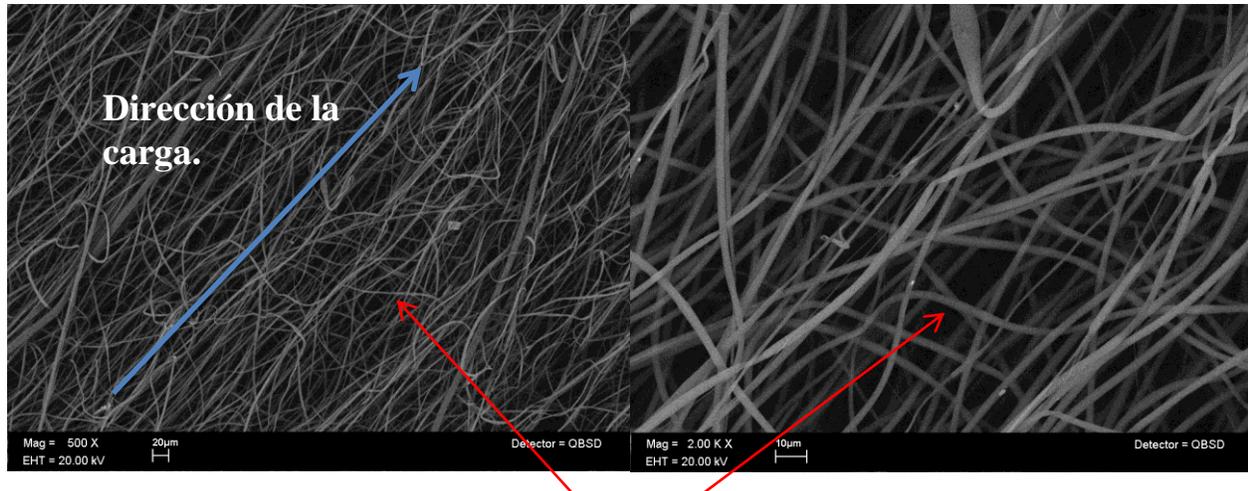


Figura 36. Diagrama - Esfuerzo vs Deformación para el PCL.

Zona B: A diferencia de los polímeros amorfos, que no presentan una región plástica, el PCL muestra esta zona debido a su arreglo molecular semicristalino. Ya que al iniciar los desplazamientos de la zona cristalina no existe una recuperación en la estructura molecular.

Sobre la curva de esfuerzo-deformación en la zona B se notan pequeñas desviaciones de la tendencia lineal durante la deformación para llegar al esfuerzo máximo σ_u . Estas variaciones se deben principalmente a que no todas las fibras actúan homogéneamente frente al esfuerzo, sino que se van orientando conforme continúa la deformación. Esto se muestra en la Figura 37. donde se observa un porcentaje de fibras no orientadas mientras el resto se ven alineadas hacia la carga.



Fibras sin aparente alineación a la carga.

Figura 37. Micrografía de una matriz después de ser sometida a la carga, se observan fibras alineadas a la carga y fibras sin orientación aparente.

Zona C: En esta zona se puede distinguir la máxima ordenada de la curva, en este punto se localiza el esfuerzo máximo o último, región donde la probeta inicia la rotura de las fibras sometidas directamente a la carga. A partir de este punto la escisión y fractura de las fibras en la matriz en forma masiva, provocan la relajación del esfuerzo hasta el punto donde el material falla por completo, identificado como esfuerzo a la rotura σ_b .

Al igual que en la zona B se distingue una variación a la tendencia lineal de la curva, causado por las fibras que no recibían una carga uniaxial y que se orientan conforme a la deformación. Se puede inferir en este caso que la cantidad de fibras que se orientan es menor dada la disminución del esfuerzo.

Las figuras 38 y 39 muestran las curvas esfuerzo-deformación para las probetas de PCL-CLG I y PCL-FQL. Donde se indican los puntos representativos de cada zona. Los valores de los datos obtenidos de las gráficas se resumen en la Tabla 8.

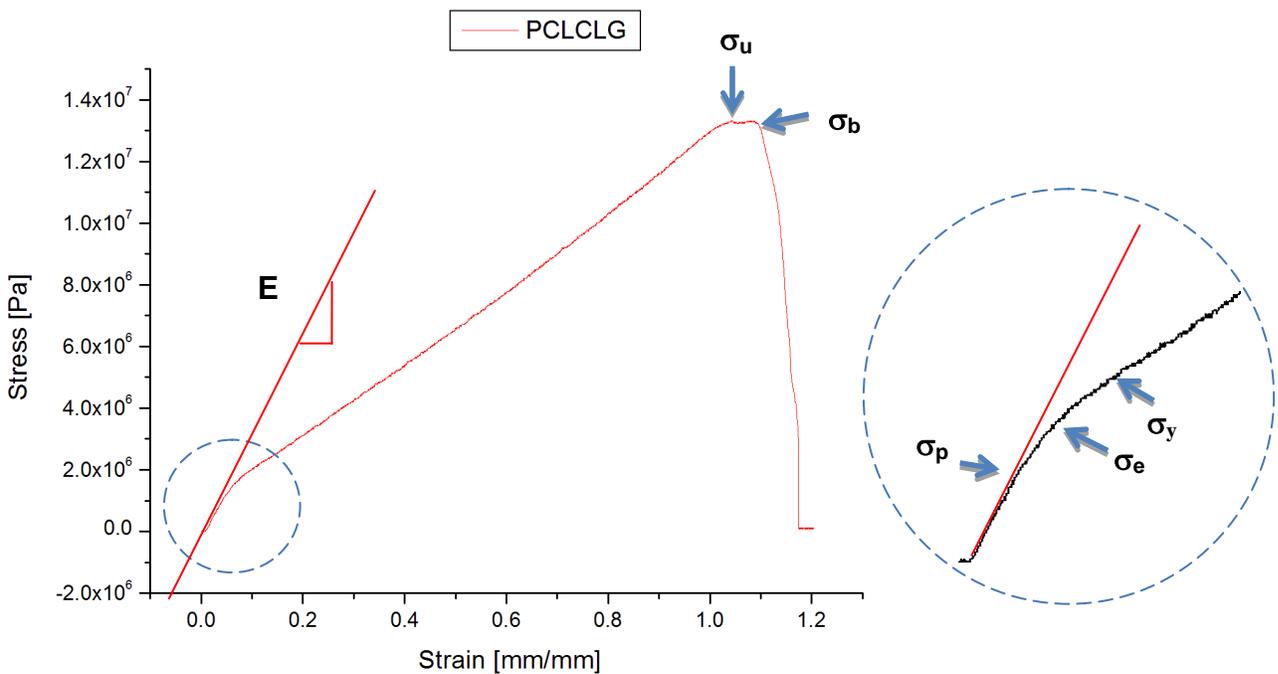


Figura 38. Diagrama esfuerzo-deformación para las muestras de PCL-CLG I. Indicación de los principales elementos de la curva.

La adición de colágena tipo I a la disolución de PCL 12% provoca una pequeña disminución de la zona elástica dado que la colágena tipo I posee un máximo de 10% de deformación en la zona elástica [114,115]. No obstante incrementó el esfuerzo máximo excesivamente. Esto es posible dadas las propiedades mecánicas de la colágena tipo I. Heim et al. [116] and Wenger et al. [117] reportan el módulo elástico en rangos de 1–2 GPa y 5–11.5 GPa respectivamente, utilizando técnicas de Microscopía de Fuerza Atómica. Sin embargo al ser una muestra porosa, ésta constante se puede ver reducida hasta ~300 MPa.

Tabla 8. Valores característicos obtenidos de las gráficas esfuerzo vs deformación.

Muestra	σ_p [MPa]	σ_e [MPa]	σ_y [MPa]	E[MPa]	σ_u [MPa]	σ_b [MPa]	ϵ_{TS} [MPa]	ϵ_m [MPa]
PCL	0.78	0.82	0.85	11.9	1.2	0.42	1.1	1.9
PCL-CLG I	1.3	1.5	1.7	19	13.3	13.2	1.03	1.08
PCL-FQL	0.27	0.32	0.35	5.6	0.93	0.90	1.75	1.78

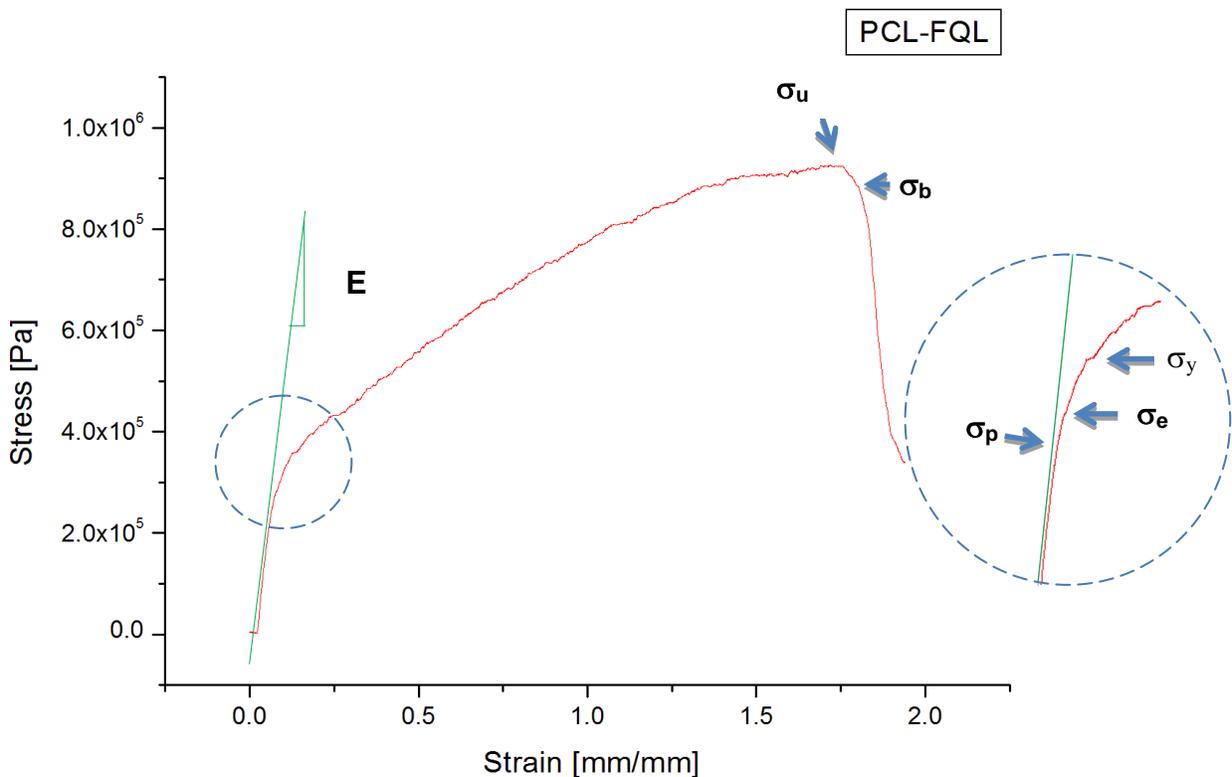


Figura 39. Diagrama Esfuerzo-Deformación de PCL-FQL. Indicación de los principales elementos de la curva.

A diferencia de la muestra de PCL-CLG I, las propiedades del PCL se vieron reducidas al mezclarlo con FQL. Como se observa en la Figura 39, la zona plástica aumentó disminuyendo el esfuerzo máximo debido a las bajas propiedades mecánicas, que confieren a la matriz propiedades elastoméricas.

Conclusiones

Se logró extraer con éxito colágena tipo I de tendón bovino por medio de un proceso enzimático sumado a disoluciones y precipitaciones.

Se cuantificó la proteína obtenida y se infirió su tipo por medio de la técnica de electroforesis.

A través de microscopía electrónica de barrido se pudo identificar la morfología de cada precursor de las matrices. Al comparar la mezcla física de PVP-CLG I con la mezcla irradiada (FQL), se puede comprobar parcialmente la formación del copolímero de injerto provocado por la radiación gamma a la que fue expuesta, ya que la estructura y morfología difiere completamente del que presenta la mezcla física.

Se lograron establecer las condiciones idóneas para el electrohilado de las matrices o membranas porosas. Esto se logró con la ayuda de microscopía electrónica de barrido, ya que es complejo saber si las membranas se hilaron adecuadamente, si se observan a simple vista, por lo que cada combinación de variables se analizó por *SEM*, identificando los cambios morfológicos en cada membrana, para lograr fibras continuas y matrices homogéneas.

El análisis por *TGA* del copolímero FQL demuestra el cambio en la degradación de los precursores al mezclarse, pues se observa una diferencia en el proceso de pérdida de masa al transcurrir el aumento gradual de temperatura.

El análisis *TGA* y *DSC* de las matrices PCL-CLG I y PCL-FQL tuvo pequeñas diferencias sobre el PCL, lo cual indica que la degradación y fusión de las matrices obtenidas corresponderá mayoritariamente a la que presente el PCL sin adicicionantes.

Las medidas por *FTIR* muestran una contribución de grupos funcionales en el espectro, correspondientes a la CLG I y el PVP de mezcla irradiada. Sin embargo los espectros

correspondientes a las matrices hiladas de PCL-CLG I y PCL-FQL no muestran una clara presencia de los adicicionantes sobre el PCL a reserva de pequeñas señales en la región donde se presentan mayoritariamente los grupos hidroxilos ($3400-3500\text{ cm}^{-1}$). Esto se puede atribuir a la baja cantidad de adicicionantes en la muestra.

Los ensayos de tensión muestran una marcada diferencia en el comportamiento mecánico de cada matriz. La adición de CLG I exclusivamente al PCL cambia drásticamente las propiedades mecánicas, lo cual se debe a las características físicas que posee ésta proteína. Mientras que la adición de FQL disminuye la resistencia del material y aumenta su plasticidad. Esto es provocado por las bajas propiedades mecánicas del PVP que en el copolímero FQL se encuentra en una proporción de ~94 (% m/m). Y a su vez el FQL en la solución (PCL-FQL) se encuentra al 0.1 (%p/v) antes de electrohilarse, lo cual reduce las atribuciones físicas de la colágena.

Referencias Bibliográficas

- [1] Shalak R, Fox CF. Preface. In: Tissue Engineering. Shalak R, Fox CF, eds. Alan R.Liss, New York. 1988. 26..
- [2] Shalak R, Fox CF. Preface. In: Tissue Engineering. Shalak R, Fox CF, eds. Alan R.Liss, New York. 1988. 26-29.
- [3] Rodríguez F. N. Aspectos farmacológicos del copolímero de colágena TI. 2013 (En prensa
- [4] Silvera Arena Luz A. La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. Salud Uninorte. Barranquilla Col., 2002 (16): 9-18,
- [5] Zhong, Shaoping. An aligned nanofibrous collagen scaffold by electrospinning and its effects on in vitro fibroblast culture. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2006 (10):1002
- [6] Labastida A. Obtención de esponjas de colágeno a partir de hueso bovino. Tesis de maestría. México 2007.
- [7] Stankus JJ, Guan JJ, Wagner WR. Fabrication of biodegradable elastomeric scaffolds with sub-micron morphologies. J Biomed Mater Res A 2004; (70):603–614.
- [8]. Xu CY, Inai R, Kotaki M, Ramakrishna S. Electrospun nano-fiber fabrication as synthetic extracellular matrix and its potential for vascular tissue engineering. Tissue Eng 2004; (7):1160–1168.
- [9] Velasco Peña, Garzón Alvarado. Scaffolds implants for the bone regeneration. Materials, techniques and modeling by means of reaction diffusion systems. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas; Ciudad de la Habana 2010;.(29) 1561-3011.
- [10] SHIEH S. J. and VACANTI J. P. State-of-the-art tissue engineering : from tissue engineering to organ building. Surgery 2005 137(1):1-7.
- [11] Piña Barba M., Murguía Acevedo N. Caracterización de hueso de bovino anorgánico: Nukbone Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México. Acta Ortopédica Mexicana 2006; 20(4): 150-155
- [12] ISO 10993-1:2009; Biological evaluation of medical devices -- Part 1: Evaluation and testing within a risk management process
- [13] Salgado A. J.; Coutinho O. P. and Reis R. L. Bone tissue engineering : state of the art and future trends. Macromol Biosci 2004 9;4(8):743-65.
- [14] Salgado A. J.; Coutinho O. P. and Reis R. L. Bone tissue engineering : state of the art and future trends. Macromol Biosci 2004 9;4(8):743-65.
- [15] Cassinelli C.; Morra M. and Aruzzone G. Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: 2. In vitro experiments. Int J Oral Maxillofac Implants 2003; 18(1):46-52.
- [16] Brånemark R, Brånemark P-I, Rydevik B., Myers R: Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation. *J Rehabilitation Res and Develop.* 2001: 38(2): 175-81.
- [17]. Parikh SN. Bone graft substitutes: past, present. *Future J of Postgraduate in Med (JPGM).* 2002; 48(2): 142-48.
- [18] Falke G. F. Y Atala A. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. Arch Argent Pediatr 2000;98(2):103-105.

- [19] Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, And Petite H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J Cell Mol Med* 2005 January;9(1):72- 84.
- [20] Li WJ, Laurencin CT, Caterson EJ, Tuan RS, Ko FK. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 2002;60(4):613-21.
- [21] Kim K, Yu M, Zong X, Chiu J, Fang D, Seo YS, Hsiao BS, Chu B, Hadjiargyrou M. Control of degradation rate and hydrophilicity in electrospun non-woven poly(D,L lactide) nanofiber scaffolds for biomedical applications. *Biomaterials* 2003; 24:4977–85.
- [22] Bhattarai SR, Bhattarai N, Yi HK, Hwang PH, Cha DI, Kim HY. Novel biodegradable electrospun membrane: scaffold for tissue engineering. *Biomaterials* 2004; 25:2595–602.
- [23] Katti DS, Robinson K, Ko F, Laurencin CT. Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: optimization of fabrication parameters. *J Biomed Mater Res* 2004;70B (2):286–96.
- [24] Yang S, Leong KF, Du Z, Chua C.K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng* 2001 7: 679-689
- [25] Hayashi T. Biodegradable polymers for biomedical uses. *Prog Polym Sci* 1994; 19: 663-702.
- [26] Los polímeros en medicina (ingeniería de tejidos), recuperado de: http://www.eis.uva.es/~macromol/curso05-06/medicina/ingenieria_de_tejidos.htm [Consulta: 22/11/2012]
- [27] Shanmuganathan S., Diseño de una matriz de soporte compuesta de colágeno de piel de tiburón-aloe para ingeniería tisular. *Ars Pharm* 2008; 49 (4): 321-340
- [28] Mikos, A. G.; Lu, L.; Temenoff, J. S. & Temmser, J. K., Synthetic Bioresorbable polymer scaffolds. In: *An introduction to material in medicine*, Elsevier Academic Press, USA, 2004, pp 743,
- [29] Mikos AG, Thorsen AJ, Czerwonka LA, Bao Y, Langer R Preparation and characterisation of poly(L-lactic acid) foams. *Polymer* 1994, 35: 1068-1077.
- [30] Mikos AG, Bao Y, Cima LG, Ingber DE, Vacanti JP, Langer R, Preparation of poly (glycolic acid) bonded fibres structures for cell attachment and transplantation. *J Biomed Mater Res*,1993, 27: 183-189.
- [31] Borden M., Attawia M., *J. Biomed., The sintered microsphere matrix for bone tissue engineering: in vivo osteoconductivity studies, Mater. Res.,2002*, 61: 421-429.
- [32] Jaklenec A., Wan E., Murray M.E., Mathiowitz E., Novel scaffolds fabricated from protein-loaded microspheres for tissue engineering, *Biomaterials*, 2008, 29: 185-192.
- [33] G.A. Silva, O.P. Coutinho, P. Ducheyne, R.L. Reis, Materials in particulate form for tissue engineering, Part 2: Applications in Bone (Review), *J. Tissue Engineering and Regenerative Medicine*,2007, 1: 97-109
- [34] Curran, S.J., Chen, R., Curran, J.M., Hunt, J.A., Expansion of human chondrocytes in an intermittent stirred flow bioreactor, using modified biodegradable microspheres. *Tissue Engineering*, 2005,11(9-10): 1312-1322
- [35] Caracciolo, P C. Matrices poliuretánicas nanofibrosas obtenidas por el proceso de electrospinning. Asociación Argentina de Materiales. INTEMA. Buenos Aires 2008.
- [36] Li, M., Mondrinos, M.J., Yang, Y., Gandhi, M.R., Ko, F.K., Yang, G., Weiss, A.S., and Lelkes, P.I., Electrospun Protein Fibers as Matrices for Tissue Engineering, *Biomaterials*, 2005, 26:5999-6008.
- [37] Dunia Mercedes García Cruz. Materiales macroporosos biodegradables basados en quitosano para la ingeniería tisular. Tesis de doctorado. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, 2008

- [38] JM Fernández. G.A. Abraham. Propiedades biológicas de matrices porosas y no porosas de PCL / PFIP. COLAOB 2008.
- [39] John Michael Colwell B. Polymers for Bone Tissue Repair. Polymers for Bone Tissue Repair. Tesis de doctorado, School of Physical and Chemical Sciences of Queensland University of Technology, 2006.
- [40] Hackett, Joanne M. Dang, ThucNhi T. Tsai, Eve C. Cao, Xudong. Electrospun Biocomposite Polycaprolactone/Collagen Tubes as Scaffolds for Neural Stem Cell Differentiation. Materials.2010.
- [41] Laleh Ghasemi-Mobarakeh, M.Sc.1, Mohammad Morshed, Electrospun Poly (ϵ -Caprolactone) Nanofiber Mat as Extracellular Matrix. Yakhteh Medical Journal, 2008, 10 (3): 179-184
- [42] Vicent Julian, Structural Biomaterials, Macmillan. UK London 1982.
- [43] Colágena, 2004, Wikipedia, La enciclopedia libre, <http://en.wikipedia.org/wiki/Collagen>. [consulta : 20/06/2012]
- [44] Gómez Lizarraga K. Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones en Materiales UNAM. México 2010.
- [45] Junter Luke, The C–F bond as a conformational tool in organic and biological chemistry. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 2010, 6 (38): 3762
- [46] Matthew D. Shoulders¹ and Ronald T. Raines. Collagen Structure and Stability. Department of Chemistry and Department of Biochemistry, University of Wisconsin US 2010, 78: 929–958.
- [47] Miller, E., *Isolation & Characterization of a Collagen from Chick Cartilage Containing Three Identical Chains*. Biochemistry, 1977. **10**(9): 1652-1659.
- [48] Uitto, J., *Collagen Polymorphism: Isolation & Partial Characterization of $\alpha 1(I)$ -Trimer Molecules in Normal Human Skin*. Biochem & Biophys, 1979. **192**(2): 371-379.
- [49] Shanmuganathan s, Design of shark skin collagen-aloe composite scaffold for tissue engineering, *Ars Pharm* 2008; 49 (4): 321-340.
- [50] Joos, U., O. G, and R. PE, *Influence of collagen fleece on bone regeneration*. Biomaterials, 1980. **1**: 23-25.
- [51] Stadlinger, B., et al., *Evaluation of osseointegration of dental implants coated with collagen, chondroitin sulphate and BMP-4: an animal study*. Int J Oral Maxillofac Surg., 2008. **37**(1): 54-9.
- [52] Linke, R., M. Ulmer, and A. Imhoff, *Replacement of the meniscus with a collagen implant (CMI)*. Oper Orthop Traumatol, 2006. **18**(5-6): 453-62.
- [53] Al-Munajjed, A., J. Gleeson, and F. O'Brien, *Development of a collagen calcium-phosphate scaffold as a novel bone graft substitute*. Stud Health Technol Inform, 2008. **133**: 11-20.
- [54] Liu, L., et al., *Preparation and characterization of collagen-hydroxyapatite composite used for bone tissue engineering scaffold*. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 2003. **31**(4): 435-48.
- [55] Furozawa Carballeda, C. Estudio Piloto sobre la eficacia del uso de la colágena-polivinilpirrolidona (clg-PVP) en la regeneración ósea en cirugía endodóncica. *Revista odontológica Mexicana* 2005; 9: 191-196
- [56] Kothapalle Sivaiah, et al; Structural and Optical Properties of Li⁺: PVP & Ag⁺: PVP Polymer Films; Materials Sciences and Applications, 2011, 2: 1688-1696

- [57] Hubertus Foltmann, PhD, and Anisul Quadir, PhD, MBA. *Polyvinylpyrrolidone (PVP) – One of the Most Widely Used Excipients in Pharmaceuticals: An Overview*. Drug Delivery Technology, 2008, 8 (6): 1-27
- [58] Robinson, B., et al., *Synthesis and Properties of PVP*, in *PVP A critical review of the kinetics and toxicology polyvinylpyrrolidone (povidone)*, I. Lewis Publishers Editor, Lewis Inc.: Michigan, USA. p. 7-21.
- [59] Torben Lenau, PCL – Polycaprolactone, 2003, <http://www.designinsite.dk/htmsider/inspmat.htm>, [Consulta: 16/01/2013]
- [60] García Cruz D. Materiales macroporosos biodegradables basados en quitosano para la ingeniería tisular. Tesis de doctorado. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, 2008
- [61] Armelin, Elaine. Síntesis y caracterización de nuevas poliésteramidas: estudio de sus propiedades, Tesis doctoral, UPC, Catalunya 2002
- [62] Armelin, Elaine. Síntesis y caracterización de nuevas poliésteramidas: estudio de sus propiedades, Tesis doctoral, UPC, Catalunya 2002
- [63]. Nishida H, Yamashita M, Nagashima M, Hattori N, Endo T, Tokima Y, *Macromolecules* 2000; 33 (17): 6595-6601.
- [64] Pitt C G, *Poly-caprolactone and its copolymers Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*, (New York: Dekker, 1990, p 71–119
- [65] Sun H, Mei L, Song C, Cui X, Wang P. The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. *Biomaterials* 2006; 27:1735–40.
- [66]. Khor, H.L., Ng, K.W., Schantz, J.T., Phan, T.T., Lim, T.C., Teoh, S.H. and Hutmacher, D.W. Poly(epsilon-caprolactone) Films as a Potential Substrate for Tissue Engineering an Epidermal Equivalent, *Mater. Science and Engineering*, 2002; 20: 71–75.
- [67]. Zhu, Y., Gao, C.Y. and Shen, J.Y., Surface Modification of Polycaprolactone with Poly(methacrylic acid) and Gelatin Covalent Immobilization for Promoting its Cytocompatibility, *Biomaterials*, 2002; 23: 4889–4895.
- [68]. Ko, Y.G., Kim, Y.H., Park, K.D., Lee, H.J., Lee, W.K., Park, H.D., Kim, S.H., Lee, G.S. and Ahn, D.J. Immobilization of Poly(ethylene glycol) or its Sulfonate onto Polymer Surfaces by Ozone Oxidation, *Biomaterials*, 2001; 22: 2115–2123.
- [69] Lim, V.W.L., Kang, E.T. and Neoh, K.G., Surface Modification of Polypyrrole Films via Grafting of Poly(ethylene glycol) for Improved Biocompatibility, *Synthetic Met.*, 2001; 119: 261–262.
- [70] Altankov, G., Thom, V., Groth, T., Jankova, K., Jonsson, G. and Ulbricht, M., Modulating the Biocompatibility of Polymer Surfaces with Poly (Ethylene Glycol): Effect of Fibronectin, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000; 52: 219–223.
- [71] Kidane, A., Lantz, G.C., Jo, S. and Park, K., Surface Modification with PEO-containing Triblock Copolymer for Improved Biocompatibility: in vitro and ex vivo Studies, *J. Biomat. Sci.-Polym. E.*, 1999; 10: 1089–1105.
- [72] Cui, F.Z. and Luo, Z.S., Biomaterials Modification by Ion-beam Processing, *Surf. Coat. Tech.*, 1999; 112: 278–285.
- [73] Tsuji, H., Satoh, H., Ikeda, S., Ikemoto, N., Gotoh, Y. and Ishikawa, J., Surface Modification by Silver-negative-ion Implantation for Controlling Cell-adhesion Properties of Polystyrene, *Surf. Coat. Tech.*, 1998; 104: 124–128.

- [74] Koleske J V, Blends containing poly-caprolactone and related polymers Polymer Blends ed O R Paul and S Neuman, New York: Academic,1978, pp 369–89.
- [75] Rodríguez Félix, Francisco. Membranas de acetato de celulosa preparadas por el método de inversión de fases o por electrohilado, su caracterización y propiedades de intercambio iónico. Tesis de Doctorado. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora México 2009
- [76] Formhals, Anton et al. Process and apparatus for preparing artificial threads, U.S. Patent 1,975,504 Issue date: October 2, 1934.
- [77] Formhals, Anton et al. Process and apparatus for preparing artificial threads, U.S. Patent 1,975,504 Issue date: October 2, 1934.
- [78] SciFinder Scholar 2007, American Chemical Society. <https://SciFinder.cas.org> 65.- Donghong, W., Shuhua, Q., Youming, W., Qunli,A., Chunhua, L. *J. Appl. Polym. Sci.* 110 (2008) 3162.
- [79] Reneker DH, Chun I. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology* 1996; 7:216–23.
- [80] Reneker DH, Yarin AL, Fong H, Koombhongse S. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *J Appl Phys* 2000; 87(9):4531–47.
- [81] Reneker DH, Chun I. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology* 1996; 7:216–23.
- [82] D. Li, Y. Xia, Electrospinning nanofibers as uniaxially aligned arrays and layer-by-layer stacked films, *Nano Lett.*, 2003; 3: 555.
- [83] D. Li, T. Herricks, Y. Xia, Magnetic nanofibers of nickel ferrite prepared by electrospinning, *Appl. Phys. Lett.*, 2003; 83: 4586.
- [84] Y. Dror, W. Salalha, R.L. Khalfin, Y. Cohen, E. Zussman, A. Yarin, "Embedded Carbon Nanotubes in Oriented Polymer Nanofibers by Electrospinning", *Langmuir* 2003; 19: 7012-7020.
- [85] H.-J. Jin, S.V. Fridrikh, G.C. Rutledge, D.L. Kaplan, Electrospinning *Bombyx mori* silk with poly(ethylene oxide), *Biomacromolecules*, 2002; 3 (6):1233-1239
- [86] J.-S. Kim, D.H. Reneker, Mechanical properties of composites using ultrafine electrospun fibers. *Polymer composites.*, *Polym. Compos.* 1999; 20(1) 124.
- [87] Bergshoef, M.M. and Vancso, G.J., *Transparent Nanocomposites with Ultrathin, Electrospun Nylon-4,6 Fiber Reinforcement*. *Advanced Materials*,1999; 11 (6): 1362-1365
- [88] Z.M. Huang, Y.Z. Zhang, M. Kotaki and S. Ramakrishna, A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites, *Composites Science and Technology*, 2003, 63(15): 2223-2253
- [89] Dzenis, Y., Spinning Continuous Fibers for Nanotechnology, *Science*, 2004, Vol. 304, pp.1917-1919
- [90] D. Li, Y. Xia, Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel?, *Adv. Mater.* 2004 16(14), 1151-1170.
- [91] Kim HW, Yu HS, Lee HH: Nanofibrous matrices of poly(lactic acid) and gelatin polymeric blends for the improvement of cellular responses. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2008, 87A:25-32

- [92] W.J. Li, R. Tuli, X. Huang, P. Laquerriere, R.S. Tuan, Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold, *Biomaterials* 2005, 26(25): 5158-5166.
- [93] H. Yoshimoto, Y.M. Shin, H. Terai, J.P. Vacanti, A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 2003; 24(12), 2077-2082.
- [94] Z.M. Huang, Y.Z. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna, A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites, *Comp. Sci. Technol.*, 2003; 63(15): 2223 – 2253.
- [95] J.H. Song, H.E. Kim, H.W. Kim, J., Electrospun fibrous web of collagen-apatite precipitated nanocomposite for bone regeneration, *Mater. Sci. Mater. Med.*, 2008; 19(8): 2925-2932
- [96] Kim, Ju-ha Song Æ Hyoun-ee Kim Æ Hae-won. Electrospun fibrous web of collagen – apatite precipitated nanocomposite for bone regeneration. *Journal of Materials*. 2008; 19: 2925-2932
- [97] J. U. Ejiófor*, M. C. Waid*, J. L. McKenzie*, R. L. Price*, and T. J. Webster, Nano-biotechnology: carbon nanofibers as improved neural and orthopedic implants, *Nanotechnology*, 2004; 15:48-54.
- [98] Guerrini, L. M.; Branciforti, M. C.; Canova, T.; Bretas, R. E. S. Electrospinning and Characterization of Polyamide 66 Nanofibers with different Molecular Weights. *Materials Research*, 2009; 12(2): 1516-1439.
- [99] Caracciolo, P C. Matrices poliuretánicas nanofibras obtenidas por el proceso de electrospinning. *Asociación Argentina de Materiales. INTEMA. Buenos Aires* 2008.
- [100] Deitzel J M, Kleinmeyer J, Harris D, Tan N C B, “The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles”. En: *Polymer*. 2001; 42: 261-272
- [101] Demir M M, Yilgor I, Yilgor E, Erman B. “Electrospinning of polyurethane fibers. En: *Polymers*. 2002; 43: 3303-3309.
- [102] Edward j. Miller and r. Kent Rhodes. Preparation and Characterization of the Different Types of Collagen.. *Methods in enzymology*, vol. 82. Academic Press, Inc. 1982
- [103] Takeshi Nagai, Nobutaka Suzuki. Preparation and partial characterization of collagen from paper nautilus (*Argonauta argo*, Linnaeus) outer skin, *Food Chemistry*, 2002; 76(2): 759-6595
- [104] Gómez L.K. Extracción y caracterización de colágena TI. Tesis de maestría. Instituto de Investigaciones en Materiales – UNAM . México 2011.
- [105] colaboradores de Koyama Laboratory, Electrospinning, 2004, http://ckpmac7.yz.yamagata-u.ac.jp/E-Page/Project/research/spinning/espining_E.htm, [consulta: 22/01/2013]
- [106] Admet, Testing the Tensile Properties of Small Plastics Summary of Test, 2013, <http://admet.com/testing-standards/astm-d1708-testing/>, [consulta: 4/03/2013]
- [107] Singelyn Jennifer M et al, Naturally derived myocardial matrix as an injectable scaffold for cardiac tissue engineering, *Biomaterials*. 2009 ;_30(29): 5409–5416.
- [108] A. Jiménez Márquez, G. Beltrán Maza. Aplicación de la Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) en la caracterización del aceite de oliva virgen, *Grasas y Aceites*, 2003; 54(4): 403-409.
- [109] IM, Foltran I, Sabbatini S, Tosi G, Roveri N, Electrospun. Nanostructured Fibers of Collagen Biomimetic Apatite on Titanium Alloy - *Bioinorg Chem Appl* 2012;2012
- [110] Sai, P. K., & Babu, M. (2001). Studies on *Rana tigerina* skin collagen. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2001; 128(B): 81–90.

- [111] Abe, Y., & Krimm, S., Normal vibrations of crystalline polyglycine I. *Biopolymers*, 1972; 11: 1817 - 1839.
- [112] Jackson, M., Choo, L., Watson, P. H., Halliday, W. C., & Mantsch, H. H., Beware of connective tissue proteins: assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995; 1270: 1–6.
- [113] Eshraghi S, Das S. George W. 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 Biomater*. 2010;6(7):2467-76
- [114]. Wang Y, Blasioli DJ, Kim HJ, Kim HS, Kaplan DL. Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes. *Biomaterials*. 2006; 27:4434-4442
- [115] James R, Kesturu G, Balian G. Tendon: Biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options. *J Hand Surg*. 2008; 33A:102-12.
- [116]. Heim, A. J., W. G. Matthews, and T. J. Koob, Determination of the elastic modulus of native collagen fibrils via radial indentation. *Appl. Phys. Lett*. 2006; 89:181902–181904.
- [117]. Wenger, M. P. E., L. Bozec, M. A. Horton, and P. Mesquida, Mechanical properties of collagen fibrils. *Biophys. J*. 2007; 93:1255–1263.
- [118] Segal K. Claudia A. Manual de Prácticas Biología Molecular de la Célula I. Facultad de Ciencias de la UNAM, México 2005.
- [119] Bolaños V. Nuria, Química de Alimentos: Manual de laboratorio, Ed. Universidad de Costa Rica, Costa Rica 2003.
- [120] Herra R. carlos, Bolaños V. Nuria, Lutz C. Giselle. Química en alimentos – manual de laboratorio, Ed. De la UC Rodrigo Facio. Costa Rica 2003.
- [121]. Chial, H. J., Thompson, H. B., and Splittgerber, A. G., A spectral study of the charge forms of Coomassie Blue G. *Analyt. Biochem*. 1993; 209, 258–266.
- [122] Nicholas J. Kruger. The Bradford Method for Protein Quantitation, *Protein protocols Handbook*, 2002.
- [123] Electroforesis, 2003, recuperada de <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celunlar/electroforesis.html>, [consulta 5/02/2013].
- [124] Fundamentos de Electroforesis, (n.f.) recuperada de: <http://depa.fquim.unam.mx/proteinas/estructura/EPpage.html>, [consulta: 12/09/2012]
- [125] *García Pérez, Hilda Marilín*. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *LABORATORIOS BETERÁ, UNIV DIAG* 2000; 1(2):31-41
- [126] Ana María Maldonado Alconada, Jesús V. Jorrín Novo , Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana* , *Práctica del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanale, 14071-Córdoba*.
- [127] Berth M, Moser FM, Kolbe M, et al: *The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007; 76(6):1223–43.
- [128] Pele, Florent, Obtención y caracterización de geles para su utilización como andamios en ingeniería de tejidos, tesis de maestría, Universitat Politècnica de Catalunya. Catalunya 2006.

[129] Grágeda Zegarra M. Montesinos S. Aplicaciones de microscopía electrónica de barrido (sem) y análisis de fractura de una aleación de Cu – 10 al. Tesis de doctorado. Facultad de ciencias físicas y matemáticas, Universidad de Chile.

[130] D.A. Skoog et al. Principios de Análisis Instrumental. Mc Graw Hill, Madrid (2002)

[131] Subagya, Análisis por Termogravimetría (TGA) del Concreto, 2009, <http://notasdeconcretos.blogspot.mx/2011/04/analisis-por-termogravimetria-tga-del.html>, [consulta: 6/03/2013].

[132] Técnicas a utilizar (análisis térmico), 2006, recuperada de: <http://www.ehu.es/imacris/PIE06/web/AT.htm>, [consulta: 01/04/2013]

[133] D.A. Skoog et al. Principios de Análisis Instrumental. Mc Graw Hill, Madrid (2002).

[134] S. Suriñach, M. D. Baro, S. Bordas, N. Clavaguera, M. T. Clavaguera-Mora. La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales, bol. soc. esp. ceram. vidr., 1992, 31 (I): 11-17

[135] Sandoval A. Rodríguez E. Aplicación del análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) para la caracterización de las modificaciones del almidón. Dyna Universidad Nacional de Colombia; 2005,72 (146):45-53

[136] Ochagavía Chueca, Ana Soraya, Estudio estructural de poliésteres derivados del 1,8-octanodiol y ácidos dicarboxílicos pares. Tesis de maestría. Universitat Politècnica de Catalunya. Catalunya España 2005.

[137] Babur Chowdhry y Stephen Leharne, Simulation and Analysis of Differential Scanning Calorimetry Output: Protein Unfolding Studies 1, J. Chem. Edu., 1997; 74(2): 236

[138] Palza Cordero H., Introducción a las Propiedades Mecánicas de Polímeros. Tesis de Doctorado en Ciencias de la Ingeniería, mención Ciencias de los Materiales, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile.

[139] Askeland R. Donald, Ciencia e Ingeniería de Materiales, Grupo editorial Iberoamericana SA de CV, México 1987

[140] Callister D. Willian, Introducción a la Ciencia e Ingeniería de los Materiales, Editorial Reverté S.A., Barcelona 1995.

[141] Diagrama esfuerzo – deformación unitaria, 2011, recuperada de: <http://mecatronica4b.blogspot.mx/2011/11/diagrama-esfuerzo-deformacion-unitaria.html>, [consulta: 3/04/2013].

Anexo I

Técnicas de Caracterización

Métodos de cuantificación de proteína.

La concentración de proteínas en una muestra es una información cualitativa que se ha utilizado en diferentes estudios biológicos entre los que se encuentran: el estudio de la estructura de una proteína, durante el proceso de diagnóstico de enfermedades, para conocer la actividad específica de una preparación enzimática, cuando se aborda un esquema de purificación de una proteína concreta etc. Para este fin existen diferentes procedimientos para cuantificar proteínas totales que se basan en la formación de complejos coloridos entre las proteínas y reactivos específicos, los complejos se apoyan en la realización de una curva patrón obtenida con una disolución de proteína cuya concentración es conocida, por ejemplo la albúmina suero bovino. [118] entre las técnicas de cuantificación destacan los métodos que se describen a continuación:

Método de Biuret: El método consiste en realizar un ensayo colorimétrico en el que se cuantifica la formación de un complejo estable entre proteínas y una solución alcalina de cobre Cu^{2+} , (reactivo de Biuret). [118] El complejo presenta un color violeta característico, que se puede observar a 310 nm o 540-560 nm, el cual se da por la coordinación de un átomo de cobre con cuatro átomos de nitrógeno en los enlaces peptídicos de las proteínas. [119]

Método de Lowry: Este proceso se divide en dos etapas, la primera, que es similar al método de Biuret donde los iones Cu^{2+} , en medio alcalino se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Esto provoca el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que participan en una segunda etapa, que es la reducción, también en un medio básico, usando el reactivo de Folin-Ciocalteu, este se

reduce por medio de los grupos fenol presentes en la proteína que da un complejo de color azul oscuro que se mide colorimétricamente. El complejo coloreado, presenta dos máximos de absorción a las longitudes de onda de 560 y 680 nm. La elección de una u otra depende de la concentración proteica de la muestra estudiada.[120]

Método de Bradford: El ensayo se basa en la unión del colorante azul de Coomassie G250 a la proteína y un cambio de color de la solución en respuesta a diferentes concentraciones de la misma. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos. Estudios detallados indican que el colorante libre puede existir en cuatro formas diferentes iónicas para las que los valores de pK_a son 1,15, 1,82 y 12,4 [121]. De las tres formas cargadas de colorante que predominan en la solución del ensayo reactivo ácido, las formas más catiónicas rojas y verdes tienen máximos de absorbancia a 470 nm y 650 nm, respectivamente. En contraste, la forma más azul del colorante aniónico, que se une a la proteína, tiene un máximo de absorbancia a 590 nm. Por lo tanto, la cantidad de proteína puede ser estimada mediante la determinación de la cantidad de colorante en la forma iónica azul. Esto se consigue mediante la medición de la absorbancia de la solución a 595 nm. [122]

Electroforesis

Es una técnica por la cual se separan biomoléculas mediante una migración diferencial en una solución o en un soporte sólido, al ser sometidas a un campo eléctrico. El término electroforesis fue introducido por primera vez en 1907 por Michaelis y empleado por primera vez en 1937 por Tiselius, impulsada en los años 50 por E. L.Durrum y Arne W.K. [123] Esta técnica es auxiliar durante la caracterización de moléculas en donde se determina la velocidad a la que estas se mueven en un campo eléctrico y se utiliza para determinar, en el caso de proteínas, la masa molecular o para detectar cambios de aminoácidos y separar cuantitativamente distintas especies moleculares para su identificación; en el caso de ácidos nucleicos se puede determinar también su tamaño.

Fundamento

El proceso se basa en la migración de moléculas ionizadas y con una carga eléctrica neta que al ser colocadas en un campo eléctrico, éstas experimentarán una fuerza de atracción hacia el polo que tenga una carga opuesta. Durante el proceso las moléculas con cargas positivas se desplazarán hacia el cátodo y aquellas cargadas positivamente se desplazarán hacia el ánodo [124].

La velocidad con que una molécula migrará está determinada por dos fuerzas: la fuerza eléctrica y la de fricción o rozamiento. La primera es responsable de la atracción de la molécula hacia uno de los electrodos. Así cuanto mayor sea el cociente carga/masa de la molécula mayor será la aceleración con que se mueva. La fuerza de fricción tiene una acción opuesta: a mayor rozamiento, menor velocidad de migración. Esta fuerza está directamente relacionada con el tamaño y forma de la molécula que migra, y con las características del medio en que se mueve. Otra fuerza que se suma a este proceso es la que se produce por el movimiento aleatorio de las moléculas (movimiento browniano) debido a que poseen energía cinética propia. Esto se denomina difusión y sigue la ley de Fick [124]. La energía cinética de las moléculas aumenta con la temperatura, por ello a mayor temperatura existe una mayor difusión (Figura 40).

La suma de todas las fuerzas que intervienen en este proceso provocan que la migración de las moléculas no sea homogénea por lo que, se ha recurrido a la migración a través de geles que actúan como tamices produciendo un frente homogéneo de moléculas separadas por su tamaño (Figura 41). Aunque esta medida reduce la velocidad de migración, esta se puede compensar con el cambio de la intensidad del campo eléctrico. Mejorando con esto la definición de los frentes moleculares.

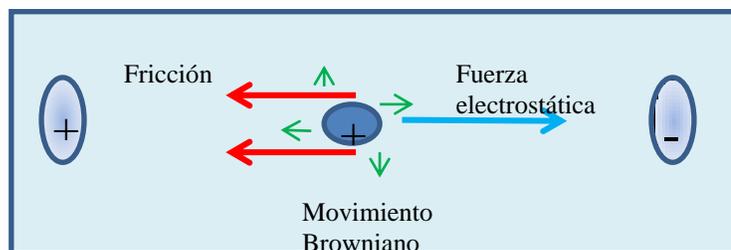


Figura 40. Cinética de las moléculas frente a un campo eléctrico.

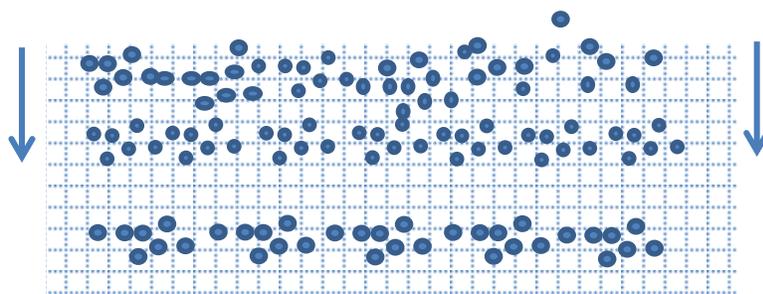


Figura 41. Migración de frentes de moléculas a través de geles que homogenizan la separación.

Existen diferentes métodos para efectuar esta técnica basada en los mismos principios básicos, entre estos se encuentran: electroforesis en geles de gradiente, electroforesis en geles de agarosa, isoelectroenfoco, electroforesis bidimensional y electroforesis en gel de poliacrilamida, la cual se describe a continuación:

Electroforesis SDS-PAGE

SDS-PAGE es la electroforesis de proteínas en geles con matriz de poliacrilamida, se lleva a cabo en presencia de detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS). Es una de las técnicas más usada para caracterizar mezclas complejas de proteínas. Fue utilizada por primera vez en 1959 por *C. Raymond y Weintraub*, quienes emplearon como soporte para la electroforesis un gel (PAGE), posteriormente el método fue perfeccionado por varios investigadores como Davis y Ornstein. [125] añadiendo el uso de desnaturizantes.

La poliacrilamida es un soporte polimérico químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y permiten buena visualización de las bandas formadas por frentes moleculares durante tiempo prolongado. [61] Conjuntamente al gel de poliacrilamida se suma el efecto del SDS, detergente de acción desnaturizante que se une a las cadenas polipeptídicas confiriendo al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa,

haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS tengan una carga relativa a su masa.

El gel PAGE forma una matriz tridimensional por monómeros de acrilamida formando cadenas lineales las cuales inician una ramificación al incluir bisacrilamida dando lugar al gel de poli(acrilamida). La ramificación induce la formación de poros que forman una red. El tamaño de ésta depende de la concentración de acrilamida y del grado de entrecruzamiento. Por lo que al variar la concentración de acrilamida y bisacrilamida en la preparación del gel se logran producir distintos grados de porosidad y por ende distintos intervalos de separación de proteínas. [127] Así, geles con un porcentaje alto de acrilamida (10-15%T) son óptimos para la separación de proteínas de menor tamaño (menores de 50kDa), mientras que geles de porcentajes menores (<10%T) son los indicados para la separación de proteínas mayores. Generalmente la relación utilizada entre acrilamida y bisacrilamida es 37,5:1. [128] Se adiciona una solución amortiguadora, que generalmente es Tris-HCl, con la intención de mantener estable el pH de los frentes moleculares. Para iniciar la polimerización de la acrilamida se añade persulfato amónico (APS) que al disolverse en agua genera radicales libres que transforman la acrilamida en radical libre y se inicia la polimerización. [123] Se añade al medio TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina) que funciona como catalizador de la reacción, de modo que la polimerización tendría lugar sin su presencia, pero sería extremadamente lenta pues se debe tener en cuenta que el O₂ inhibe la polimerización de la acrilamida.

Para mantener desnaturalizadas las proteínas, cada muestra mezcla en cierto porcentaje con el detergente aniónico a 100°C. El SDS tiene la propiedad de unirse a las cadenas polipeptídicas desnaturalizadas con una relación de 1.4 g de SDS por g de proteína, uniéndose aproximadamente una molécula de SDS por cada dos aminoácidos de la cadena. En el complejo SDS-proteína la carga de la proteína queda enmascarada por la de las múltiples moléculas de SDS y es proporcional sólo a la masa de la proteína pues todas tienen la misma carga por unidad de masa, haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS viajen hacia el ánodo. Se puede entonces determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de

pesos moleculares conocidos. Esta electroforesis es discontinua pues utiliza dos geles: Un gel concentrador con bajo grado de reticulación y pH 6,8 (gel acumulador o “stacking gel”). Un gel separador con grado de reticulación mayor con valores entre 6% y 15%, pudiéndose también utilizar gradientes de concentración de acrilamida (gel separador).

Microscopía Electrónica de Barrido.

La microscopía electrónica de barrido (*SEM*) es una técnica que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado [129], a través de un equipo que genera un haz puntual de electrones sobre una muestra. La interacción del haz sobre el material produce varios tipos de señales, tales como: rayos X característicos, electrones retrodispersados, electrones secundarios, electrones Auger, rayos X continuos, entre otros (Figura 42).

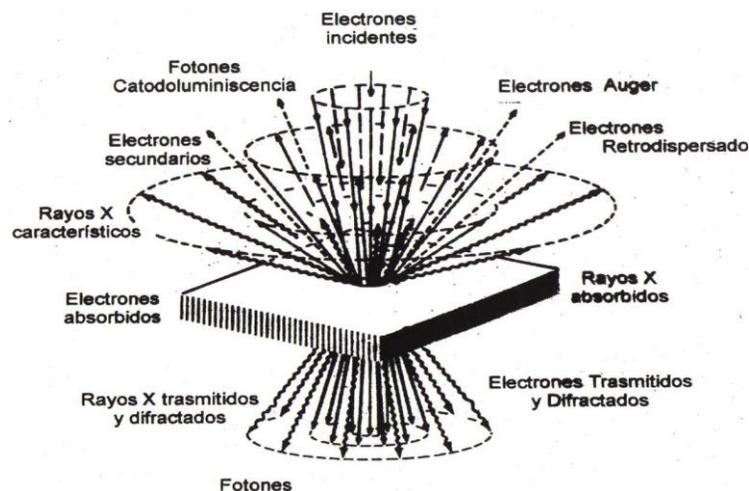


Figura 42. Señales generadas al interactuar el haz de electrones con la muestra en *SEM*.

El microscopio generalmente opera con un detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución, un detector de electrones retrodispersados que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie, ya que el haz depende del número atómico del material permite distinguir fases de un material de diferente composición química; y un detector de energía dispersiva *EDS* (Energy

Dispersive Spectrometer) permite coleccionar los Rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis e imágenes de distribución de elementos en superficies pulidas [129]. Los componentes de un sistema clásico de microscopía electrónica de barrido se muestran en la Figura 43.

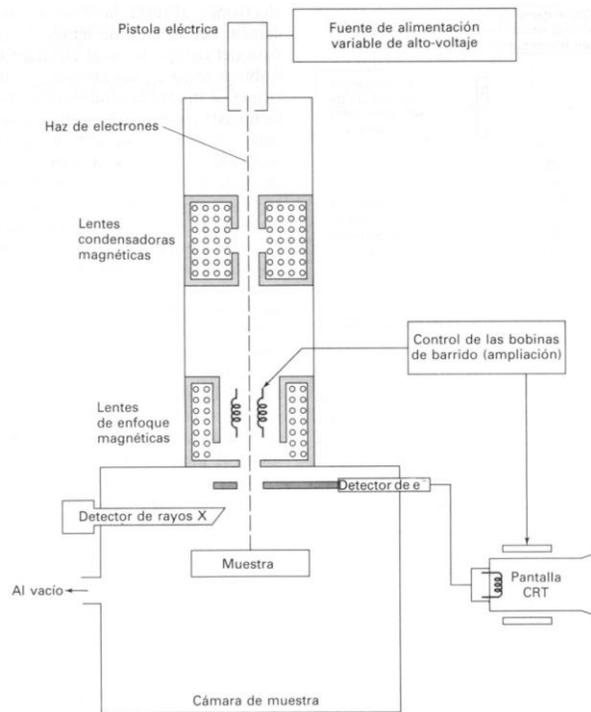


Figura 43. Diagrama de elementos básicos de MEB. [130]

Análisis Termogravimétrico

El análisis por termogravimetría (*TGA: Termogravimetric analysis*) es una técnica que mide la variación porcentual de la masa de una muestra a medida que se calienta (o se enfría) a una velocidad controlada. El cambio de masa de la muestra depende de la composición de la muestra, de la temperatura, de la tasa de calentamiento y el tipo de atmósfera controlada en la que se lleva a cabo el proceso (aire, oxígeno, nitrógeno, argón u otro gas). [131]

El análisis térmico a través del TGA permite la identificación, control de pureza y estabilidad de los materiales, ya que las transiciones de estado ocurren a temperaturas características para cada una de ellos. Este análisis, registra la masa de la muestra en función de la temperatura o del tiempo de calentamiento, mediante el empleo de una termobalanza a través de programas de calentamiento dinámico o de temperatura fija (proceso isotérmico). El registro de estos cambios nos dará información sobre si la muestra se descompone o reacciona con otros componentes [132].

La Termogravimetría puede utilizarse conjuntamente con otras técnicas, como por ejemplo *DSC*, ya que permiten obtener información complementaria sobre el comportamiento térmico de una muestra.

Los elementos básicos del sistema termogravimétrico se indica en la Figura 44.

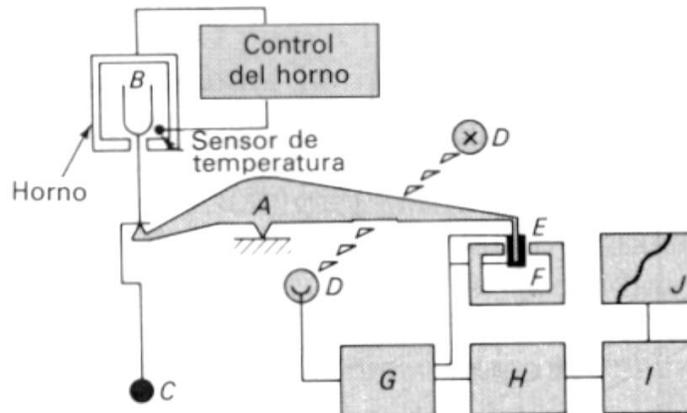


Figura 44.- Esquema de un diseño de termobalanza [133]: A) brazo; B) copa y soporte de muestra; C) contador de peso; D) lámpara y fotodiodos; E) bobina; F) imán; G) control del amplificador; H) calculador de tara; I) amplificador; J) registro.

Calorimetría Diferencial de Barrido

La calorimetría diferencial de barrido, o *DSC*, es una técnica experimental dinámica que permite detectar transiciones que implican intercambio de energía, sea almacenamiento de calor (procesos endotérmicos) o liberación de calor (procesos exotérmicos) en una sustancia, cuando esta se lleva y mantiene a temperatura constante, durante un tiempo

determinado, o cuando es calentada o enfriada a velocidad constante, en un determinado intervalo de temperaturas. [134]

El equipo de ensayo dispone de dos cápsulas. Una de ellas contiene la muestra a analizar y la otra está generalmente vacía, usada como cápsula de referencia. Se usan calefactores individuales para cada cápsula y un sistema de control comprueba si se producen diferencias de temperatura entre la muestra y la referencia (Figura 45). Si se detecta cualquier diferencia, los calefactores individuales se corregirán de tal manera que la temperatura se mantendrá igual en ambas cápsulas. Es decir, cuando tiene lugar un proceso exotérmico o endotérmico, el instrumento compensa la energía necesaria para mantener la misma temperatura en ambas cápsulas [134]. La muestra y la referencia se calientan de manera independiente por lo que se puede medir directamente la diferencia entre el flujo de calor para mantener un la misma temperatura en ambas. Por lo tanto los datos se obtienen en forma de entradas diferenciales de calor (dH/dt) en función de la temperatura [135]. Con estos datos puede determinarse la temperatura de transición vítrea (T_g), el punto de fusión (T_f), la temperatura de descomposición (T_d), la temperatura de cristalización (T_c), las entalpías de fusión y cristalización (ΔH_f y ΔH_c), así como evaluar cambios estructurales entre forma cristalina y estudiar la cinética de cristalización. [136]

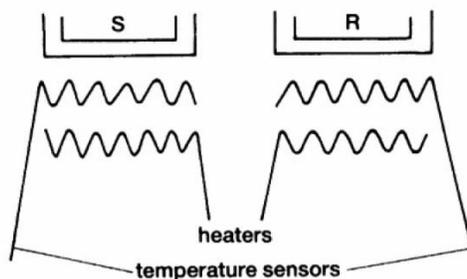


Figura 45. Principio de DSC. Una muestra (S) y una referencia (R) se calientan de manera controlada por los sensores de temperatura. [137]

Ensayo de Tensión.

Cuando se diseñan elementos estructurales implica conocer la resistencia y rigidez de los materiales a utilizar, estas características se pueden determinar si se evalúan los

materiales por medio de pruebas mecánicas. En el caso de los materiales utilizados en este trabajo el ensayo que más datos puede aportar para conocer su comportamiento, es el ensayo a tensión. Ya que las matrices obtenidas se verán sometidas a deformaciones principalmente debido a su aplicación.

El ensayo de tensión consiste en someter a probetas, generalmente con medidas estandarizadas, a una fuerza uniaxial en sentidos opuestos, a una velocidad de deformación constante, y medir el esfuerzo necesario para cada deformación, esto se realiza generalmente hasta que el material se fractura. Con este proceso se obtiene una curva donde en el eje de las abscisas se muestra la deformación del material y en el eje de las ordenadas la tensión requerida. Es importante señalar que para independizarse de las dimensiones particulares de cada probeta, en lugar de analizarse con fuerzas (F) se utiliza la tensión o carga (σ , stress) la cual se define como la fuerza aplicada por unidad de área transversal a la deformación (A) [138]:

$$\sigma = \frac{F}{A(t)}$$

Con la deformación (“strain”) sucede algo similar y se trabaja generalmente con la deformación nominal o de ingeniería:

$$\varepsilon = \frac{l - l_0}{l_0} = \frac{\Delta l}{l_0}$$

Donde “ l_0 ” se refiere al largo inicial de la muestra y “ l ” a la longitud final de la probeta [73]. Estos valores permiten determinar el esfuerzo y la deformación que al graficar originan el denominado diagrama de esfuerzo y deformación. Los diagramas son similares si se trata del mismo material y de manera general permite agrupar los materiales dentro de dos categorías con propiedades afines que se denominan materiales dúctiles y materiales frágiles. Los diagramas de materiales dúctiles se caracterizan por ser capaces de resistir grandes deformaciones antes de la rotura, mientras que los frágiles presentan un alargamiento bajo cuando llegan al punto de rotura. En el caso de los

polímeros, el comportamiento mecánico tiene dependencia con la temperatura y la velocidad de deformación, lo anterior debido a su comportamiento viscoelástico, no obstante si el material se ensaya bajo condiciones similares a las que se aplicará, se tendrán datos más confiables.

El diagrama Esfuerzo-Deformación para los polímeros cambiará según la estructura de las cadenas poliméricas que los componen, como se muestra en la Figura 46 [138].

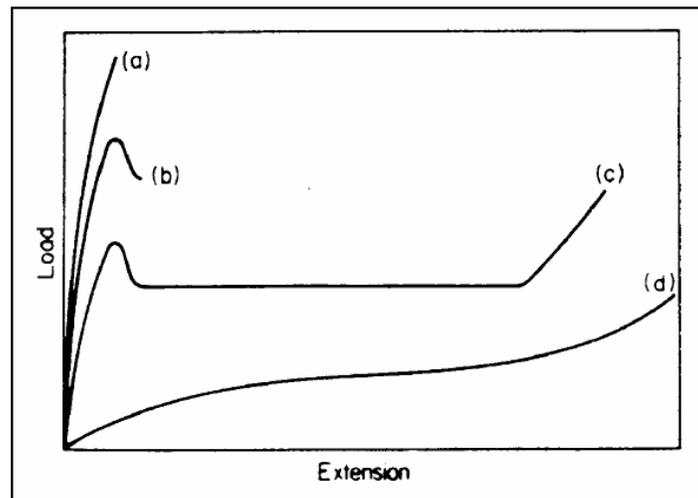


Figura 46. Curvas típicas para ensayos de tracción-deformación: a) fractura de polímeros frágiles ; b) fractura dúctil; c) polímeros semicristalinos; d) deformación de elastómeros.

Muchos polímeros se cristalizan parcialmente al ser enfriados por debajo de la temperatura de fusión, lo que provoca que varias cadenas se acerquen y se ordenen estrechamente a lo largo de distancias apreciables. [139] Las cadenas plegadas se ordenan en tres dimensiones formando laminillas como pequeños arreglos cristalinos unidos entre sí por cadenas con estructuras amorfas como se indica en la Figura 47.

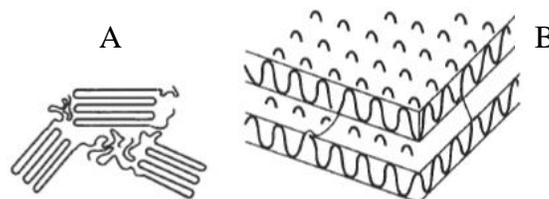


Figura 47. A) Modelo de cadenas plegadas en 2D, B) Arreglo en tres dimensiones.

Los polímeros semicristalinos poseen un mecanismo de deformación plástica debido a la interacción de las laminillas con las regiones amorfas intermedias al recibir una carga. Este proceso ocurre en varias etapas, que se indica en la Figura 48.

- Etapa inicial de la deformación las laminillas se deslizan una con respecto a otra y la región amorfa se extiende.
- En la segunda etapa las laminillas se alinean unidireccionalmente al esfuerzo aplicado.
- Una tercera etapa está dada por la separación de las laminillas en segmentos de bloques cristalinos que continúan unidos por las intercadenas amorfas.

Finalmente en una cuarta etapa los conjuntos cristalinos y las cadenas unión se orientan completamente en dirección del esfuerzo aplicado formando una estructura altamente orientada que genera una zona plástica después de llegar a un punto de fluencia donde el material inicia fracturas dispersas [140].

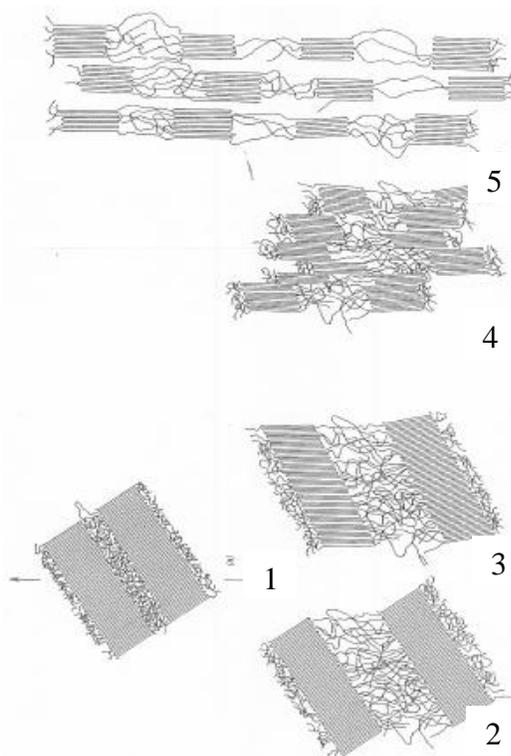


Figura 48. Etapas de deformación de un polímero semicristalino, la etapa 1 corresponde al polímero antes de recibir la carga.

Este comportamiento genera una curva típica que puede contener los elementos indicados en la Figura 49. [141].

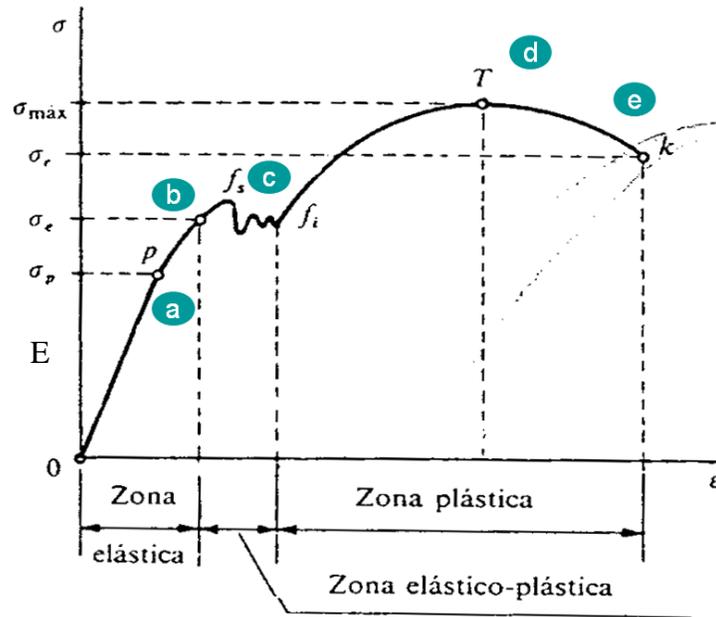


Figura 49. Principales elementos en un diagrama esfuerzo – deformación general.

Módulo elástico: se genera por la recta que va desde el origen hasta el punto llamado límite de proporcionalidad (σ_p). Este segmento rectilíneo, representa la zona elástica del material de donde se deduce la relación de proporcionalidad entre la tensión y la deformación enunciada en el año 1678 por Robert Hooke conocida como Módulo Elástico o Módulo de Young (E).

Límite elástico (σ_e): Es la tensión más allá del cual el material no recupera totalmente su forma original al ser descargado, sino que queda con una deformación residual llamada deformación permanente [140].

Punto de fluencia (σ_y): En este punto aparece un considerable alargamiento o fluencia del material sin el correspondiente aumento de carga que, incluso, puede disminuir mientras dura la fluencia. Sin embargo, el fenómeno de la fluencia es característico del acero al carbono, mientras que hay otros tipos materiales, en los que no manifiesta.

Esfuerzo último: Es el máximo esfuerzo que experimenta el material antes de iniciar el proceso que lleva a la falla del material. Este esfuerzo le da la propiedad al material conocida como resistencia σ_u .

Esfuerzo de Rotura (σ_b): Es el esfuerzo generado durante la falla del material. A partir de este punto el esfuerzo disminuye precipitadamente.