



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA DE MATERIALES**

***CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL COPOLÍMERO COLÁGENA-  
POLIVINILPIRROLIDONA Y EL EFECTO DE LA RADIACIÓN GAMMA EN SU  
ESTRUCTURA***

**T E S I S**

Que para optar por el grado de:  
**MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**  
**IQ. BLANCA GRACIELA MEDINA VARA**

**TUTOR:**  
**DR. ENRIQUE JAIME LIMA MUÑOZ**  
Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM

**COMITÉ TUTOR:**  
**DR. FERNANDO EDGAR KRÖTZSCH GÓMEZ**  
Posgrado en Ciencias e Ingeniería de Materiales  
**DR. JAIME SÁNCHEZ VALENTE**  
Posgrado en Ciencias e Ingeniería de Materiales

**MÉXICO, D.F. JUNIO 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA DE MATERIALES

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

*CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL COPOLÍMERO  
COLÁGENA-POLIVINILPIRROLIDONA Y EL EFECTO DE LA  
RADIACIÓN GAMMA EN SU ESTRUCTURA*

## T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**IQ. BLANCA GRACIELA MEDINA VARA**

TUTOR:

**DR. ENRIQUE JAIME LIMA MUÑOZ**

COMITÉ TUTOR:

**DR. FERNANDO EDGAR KRÖTZSCH GÓMEZ  
DR. JAIME SÁNCHEZ VALENTE**



---

“La Maestría en Ciencias e Ingeniería de Materiales  
Universidad Nacional Autónoma de México, pertenece al Padrón de  
Posgrados con Nivel de Excelencia del CONACYT”.

---

---

## **DIRECTORES DE TESIS**

### **Dr. Enrique Jaime Lima Muñoz**

Investigador Titular "B", T.C.

Jefe del Departamento de Materiales Metálicos y Cerámicos.

**Universidad Nacional Autónoma de México**

### **Dr. Fernando Edgar Kröttsch Gómez**

Investigador en Ciencias Médicas "D".

Jefe de Laboratorio de Tejido Conjuntivo, CENIAQ.

**Instituto Nacional de Rehabilitación**

### **Dr. Jaime Sánchez Valente**

Investigador.

Gerente de Desarrollo de Materiales y Productos Químicos

Dirección de Investigación en Transformación de Hidrocarburos

**Instituto Mexicano del Petróleo**

---

---

## JURADO DE EXAMEN

**Dra. María Cristina Piña Barba**

**Presidente** \_\_\_\_\_

Departamento de Materiales Metálicos y Cerámicos  
Instituto de Investigaciones en Materiales  
Universidad Nacional Autónoma de México - UNAM

**Dr. Enrique Jaime Lima Muñoz**

**Primer Vocal** \_\_\_\_\_

Departamento de Materiales Metálicos y Cerámicos  
Instituto de Investigaciones en Materiales  
Universidad Nacional Autónoma de México - UNAM

**Dr. Gerardo Leyva Gómez**

**Segundo Vocal** \_\_\_\_\_

Laboratorio de Tejido Conjuntivo  
Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados  
Instituto Nacional de Rehabilitación - INR

**Dr. Ariel Guzmán Vargas**

**Tercer Vocal** \_\_\_\_\_

Departamento de Ingeniería Química  
Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas  
Instituto Politécnico Nacional - IPN

**Dr. Carlos Felipe Mendoza**

**Secretario** \_\_\_\_\_

Departamento de Biociencias e Ingeniería  
Centro Interdisciplinario de Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo  
Instituto Politécnico Nacional - IPN

---

---

DE DEDICATORIA

*Al ser más maravilloso, sincero, paciente y amoroso..*

*Gracias por estar en todo momento conmigo,*

*por enseñarme el verdadero sentido de la vida*

*por alegrar siempre mis días y mucho más..*

*Gracias por dedicarte a hacerme realmente feliz.*

*Gracias Padre.*

*Con amor para mis padres y hermanos por su apoyo incondicional.*

*Y a mi mejor amigo y cómplice Oscar que amo con todo mi ser.*

*Blanca Graciela*

---

---

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a el Instituto de Investigaciones en Materiales y a el Instituto Nacional de Rehabilitación por hacer posible el desarrollo de este proyecto profesional.

La presente Tesis representa un gran esfuerzo no sólo de mi parte, sino de quienes participaron directa o indirectamente, y que sin duda la enriquecieron. Agradezco a los que leyeron, opinaron, corrigieron y me tuvieron paciencia, me dieron ánimo y acompañaron en todo momento.

Agradezco al Dr. Enrique J. Lima Muñoz por su paciencia, por llevar a buen destino el análisis de mis experimentos, por su valioso apoyo, consejos para la realización de este proyecto y la escritura de ésta tesis.

Agradezco al Dr. F Edgar Kröttsch Gómez quien gestó la idea de mi proyecto de tesis, por sus valiosos consejos y comentarios que enriquecieron mis experimentos, por su confianza y paciencia.

Al Dr. Jaime Sánchez Valente, gracias por el apoyo para realizar este proyecto y por el ánimo que me brindó siempre incondicionalmente.

Al Dr. Gerardo Leyva Gómez por su apoyo incondicional en la liofilización de las muestras y el análisis DSC, a la Biol. Gabriela Espinosa Molina por enseñarme la técnica de Electroforesis, al Q. Miguel Canseco Martínez por su apoyo en la obtención de los espectros FTIR, al Q. Gerardo Cedillo por apoyarme en el análisis de RMN-MAS, al Dr. Omar novelo Peralta por su apoyo en microscopía SEM, al Q. Carlos Flores por su apoyo en microscopía AFM y a la empresa Áspid S. A de C. V por la donación de la colágena y la pvp.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para poder llevar a cabo mis estudios de maestría. Al financiamiento económico del proyecto CONACyT 220436.

Gracias también a mis queridos compañeros, colegas y maestros que me apoyaron sinceramente a cumplir mis metas.

---

# ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	I
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	IV
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	VI
<b>Resumen</b> .....	7
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	8
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	12
Objetivo general	
Objetivos particulares	
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	13
<b>IV. ANTECEDENTES</b> .....	14
IV.1 Colágena.....	14
IV.2 Polivinilpirrolidona.....	20
IV.3 Copolímero CLG-PVP.....	22
<b>V. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b> .....	23
V.1 Materiales.....	23
V.1.1 Colágena nativa.....	23
V.1.2 PVP.....	25
V.1.3 PVP irradiada (PVP- $\gamma$ ).....	26
V.1.4 Colágena + Polivinilpirrolidona.....	26
V.1.5 Copolímero CLG-PVP.....	26
V.2 CARACTERIZACIÓN.....	26
V.2.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	26
V.2.1.1 Corrida electroforética .....	27
V.2.2 Espectroscopía, FTIR.....	28
V.2.3 Resonancia magnética nuclear, RMN.....	28
V.2.4 Microscopía electrónica, SEM y AFM.....	29
V.2.5 Calorimetría diferencial de barrido, DSC.....	29
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	30
VI.1 Determinación de la concentración de colágena.....	30
VI.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	30
VI.3 Espectroscopía IR.....	31
VI.4 Resonancia magnética nuclear.....	34
VI.4.1 Espectroscopía $^1\text{H}$ RMN en estado líquido.....	35
VI.4.2 Espectroscopía $^{13}\text{C}$ CP/Mas de RMN en estado sólido.....	38

---

VI.5	Microscopía electrónica SEM y AFM.....	44
VI.5.1	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	44
VI.5.2	Microscopía de fuerza atómica (AFM).....	48
VI.6	Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	52
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>57</b>
<b>VIII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>58</b>
<b>IX.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>60</b>

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Estructura de la colágena.....	8
<b>Figura 2.</b> Biosíntesis de la colágena.....	17
<b>Figura 3.</b> Estructura de la triple hélice de la colágena.....	18
<b>Figura 4.</b> Puentes de hidrógeno en las cadenas de la colágena.....	19
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de polimerización de la PVP en solución acuosa.....	21
<b>Figura 6.</b> Gel de colágena, cadenas $\alpha_1$ y $\alpha_2$ .....	30
<b>Figura 7.</b> Espectros FTIR en solución de las muestras de CLG, PVP, PVP- $\gamma$ , CLG + PVP y CLG-PVP en estado líquido.....	32
<b>Figura 8.</b> Espectros FTIR de las muestras liofilizadas de CLG, PVP, PVP- $\gamma$ , CLG + PVP y CLG-PVP.....	33
<b>Figura 9.</b> Espectro $^1\text{H}$ RMN de PVP y PVP- $\gamma$ .....	35
<b>Figura 10.</b> Espectros $^1\text{H}$ RMN de CLG, PVP, PVP- $\gamma$ , CLG + PVP, CLG-PVP y CLG-PVP/SE.....	36
<b>Figura 10 a.</b> Hidrógenos identificados en los espectros $^1\text{H}$ RMN.....	37
<b>Figura 11.</b> Espectros $^{13}\text{C}$ CP MAS de RMN de colágena con pulsos de contacto de (1) 5 ms, (2) 1 ms y (3) 100 $\mu\text{s}$ .....	38
<b>Figura 12.</b> Espectros $^{13}\text{C}$ CP MAS de RMN de Colágena nativa.....	39
<b>Figura 12a.</b> Aminoácidos más abundantes en la colágena.....	39
<b>Figura 13.</b> Espectros $^{13}\text{C}$ CP MAS RMN de PVP (verde) y PVP- $\gamma$ (naranja) con diferentes pulsos de contacto.....	40
<b>Figura 14.</b> Espectros $^{13}\text{C}$ CP MAS RMN de CLG + PVP con pulsos de contacto de 100 $\mu\text{s}$ , 1ms y 5ms.....	41
<b>Figura 15.</b> Espectros $^{13}\text{C}$ CP MAS RMN de CLG-PVP a pulsos de contacto de 1ms y 100 $\mu\text{s}$ .....	41
<b>Figura 16.</b> Espectros $^{13}\text{C}$ CP MAS RMN de CLG-PVP y CLG-PVP/SE.....	42

---

<b>Figura 18.</b> Micrografías de colágena, la barra de escala es equivalente a (A) 10 $\mu\text{m}$ y (B) 100 $\mu\text{m}$ con aumentos de 500x y 200x respectivamente.....	44
<b>Figura 19.</b> Imagen SEM de una fibra de colágena nativa, la barra de escala es equivalente a 1 $\mu\text{m}$ . Aumento de 20000 x.....	45
<b>Figura 20.</b> Imagen SEM de PVP, la barra de escala es equivalente a 1 $\mu\text{m}$ . Aumento 10 000x.....	45
<b>Figura 21.</b> Micrografías de la mezcla CLG + PVP y el copolímero CLG-PVP, la barra de escala es equivalente a 10 $\mu\text{m}$ (E y G) y 1 $\mu\text{m}$ (F y H). Aumentos de (E y G) 500x y (F y H) 10 000x.....	46
<b>Figura 22.</b> Imagen SEM de CLG-PVP/SE, la barra de escala es equivalente a 1 $\mu\text{m}$ con aumento de 25 000x.....	47
<b>Figura 23.</b> Precursores del copolímero CLG-PVP. La flecha en CLG señala una fibrilla colágena.....	48
<b>Figura 24.</b> Imagen AFM de la mezcla liofilizada de CLG+PVP (topografía y 3D).....	49
<b>Figura 25.</b> Imágenes AFM del copolímero CLG-PVP, CLG-PVP (3D) y CLG-PVP/SE.....	51
<b>Figura 26.</b> Termogramas DSC de la muestras en estado sólido (liofilizadas). (a) PVP, (b) PVP- $\gamma$ , (c) CLG, (d) CLG+PVP, (e) CLG-PVP y (f) CLG-PVP/SE.....	53
<b>Figura 27.</b> Termogramas DSC de la muestras en estado líquido. (a) PVP, (b) PVP- $\gamma$ , (c) CLG, (d) CLG+PVP, (e) CLG-PVP y (f) CLG-PVP/SE.....	54

---

---

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los tipos de colágena.....	9
<b>Tabla 2.</b> Reactivos utilizados en la preparación del gel de acrilamida.....	27
<b>Tabla 3.</b> Concentración de colágena en las muestras bajo estudio.....	30
<b>Tabla 4.</b> Parámetros térmicos de las muestras liofilizadas y en solución.	56

---

## RESUMEN

El copolímero de colágena con polivinilpirrolidona (CLG-PVP) se generó a partir de la radiación gamma de la mezcla de colágeno de tipo I y PVP de bajo peso molecular. Este copolímero se caracteriza por sus propiedades hemostáticas, cicatrizantes, inmunomoduladoras, fibrolíticas y antifibróticas. En este trabajo se utilizaron diferentes técnicas de caracterización fisicoquímica y biológica, para caracterizar la estructura y algunas propiedades del CLG-PVP. La mezcla del copolímero CLG-PVP inicialmente contiene 16 veces más PVP que colágena, pero sólo el 55,8% de PVP interaccionó con la colágena. La caracterización (IR) de las muestras sugieren que la mezcla de CLG con PVP propicia la formación de puentes de hidrógeno, el excedente de PVP ejerce una deformación estructural debido a la existencia de enlaces débiles que proporcionan protección a la triple hélice en los espectros de RMN cuando ésta se fragmenta por la radiación gamma.

Las microscopías SEM y AFM muestran al copolímero CLG-PVP como una fragmentación de fibras reordenadas de colágena recubiertas por una película uniforme de PVP con una superficie más rugosa que la muestra de colágena. El análisis calorimétrico mostró que el copolímero en solución tiene cambios estructurales a 110 °C, mientras que la forma liofilizada mostró estos cambios a temperaturas inferiores a 50 °C.

---

## I. INTRODUCCIÓN

La colágena o colágeno es la proteína principal del tejido conectivo, el principal componente estructural de la piel y de los huesos (Kjær M, 2004). La colágena tiene alta resistencia a la tracción, su biodegradabilidad es controlable y en contacto con células o tejidos promueve el crecimiento celular. La colágena se ha aplicado en biomédica y biotecnología, por ejemplo en la liberación de fármacos, el tratamiento de quemaduras, inflamaciones, heridas y como sustrato en la ingeniería de tejidos, (Covington A, 1997; Yadavalli V, 2010).

La colágena (CLG) se origina del monómero tropocolágeno que mide alrededor de 300 nm de largo y 1.5 nm de diámetro. El tropocolágeno está formado por tres cadenas polipeptídicas llamadas cadenas alfa. Cada cadena  $\alpha$  está constituida por un polipéptido, formado por una repetición en tándem de tres aminoácidos, conteniendo en alta concentración prolina o hidroxiprolina y glicina, las cuales son fundamentales en la formación de la superhélice, figura 1. La hidroxiprolina (OHPro) constituye alrededor de un 10 a 12% de todos los residuos aminoacídicos en la colágena, aunque el porcentaje varía dependiendo del tipo de colágena, (Hulmes D, 2002). La forma química más abundante de la hidroxiprolina en la colágena es la 4-trans-OH-L-prolina. Cada cadena tiene un peso molecular de alrededor de 100000 Da. Su estructura molecular se caracteriza por la repetición de secuencias Glicina-Prolina-Hidroxiprolina (Gli-Pro-OHPro o G-X-Y) y la estructura secundaria de triple hélice construida por tres cadenas de polipéptidos (Hulmes D, 2008; Brinckmann J, 2005).

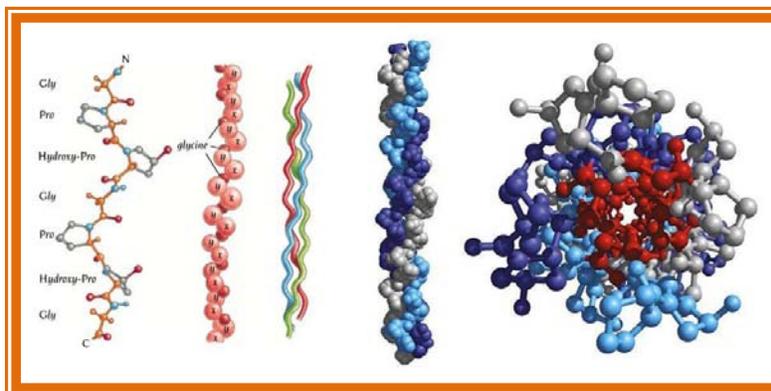


Figura 1. Estructura de la colágena en donde el tamaño pequeño de la glicina permite que se entrecrucen tres cadenas, mientras que la rigidez que produce el anillo de prolina favorece la posición helicoidal.

Los tipos de colágena humana que se conocen son 27, los cuales se denominan por un número romano, y se diferencian por la secuencia de los aminoácidos que componen las cadenas polipeptídicas  $\alpha$ , (Kadler K, et al., 2007; Myllyharju J and Kivirikko K, 2004; Blum R et al., 2005). Se pueden subdividir en diferentes clases de acuerdo a su estructura molecular como se especifica en la tabla 1.

Clase	Tipos
Colágena fibrilares	I*, II, III, V*, XI*, XXIV, XXVII
Colágenas de membrana basal o formadores de mallas	IV*, VIII*, X, XXVI
Asociación de fibrillas de colágena con interrupción en su triple hélice, FACIT (por sus siglas en inglés)	IX*, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII
Asociación de membranas con interrupción en la triple hélice, MACIT (por sus siglas en inglés)	XIII, XVII, XXIII, XXV
Otro tipo de colágenas como de anclaje	VII, XV, XVIII, VI*

Tabla 1. Clasificación de los tipos de colágena

Los tipos de colágena marcados con asterisco son heterotrímeros, compuestos de dos o tres cadenas polipeptídicas distintas. La colágena tipo IV posee seis cadenas polipeptídicas diferentes que forman al menos tres moléculas distintas y la colágena tipo V posee tres cadenas polipeptídicas en probablemente tres moléculas.

Todas las clases de colágena forman una triple hélice; sin embargo, la longitud de ésta, así como la naturaleza y el tamaño de la porción no helicoidal de la molécula es lo que determina el tipo de colágena. Por ejemplo, la colágena tipo I (300 nm) tiene su estructura anular rígida, gracias a que la prolina estabiliza la conformación helicoidal en cada una de sus cadenas  $\alpha$ ; la glicina, en cambio, se sitúa ocupando un lugar cada tres residuos, localizándose a lo largo de la región central, debido a su tamaño pequeño, favoreciendo el empaquetamiento denso de

---

las tres cadenas  $\alpha$  de configuración levógira, necesario para la formación de la superhélice de colágena.

Buscando evitar el entrecruzamiento intermolecular de la colágena, se ha mezclado a la colágena con polivinilpirrolidona (PVP) para crear formadores de implantes bioequivalentes que no sean totalmente absorbibles. El uso de la PVP se debe a su biocompatibilidad, baja toxicidad, características como formador de película y adhesivo, el comportamiento relativamente inerte hacia las sales y ácidos y su resistencia a la degradación térmica en solución (Robinson B, et al., 1990; Horikoshi S, et al., 2001). La polivinilpirrolidona es un polímero inerte, prácticamente no metabolizable que se excreta por vía urinaria (95%) en un período menor a 24 h, (Furuzawa J, et al., 2003). A la mezcla de colágena con PVP irradiada con rayos gamma, se ha etiquetado como CLG-PVP, la cual se ha mostrado como muy estable, sugiriéndose entonces una interacción covalente entre los dos polímeros. La irradiación gamma sobre la colágena puede provocar 1) la formación de enlaces cruzados intermoleculares, aumentando así el peso molecular, lo que se traduce en la estabilidad de la estructura, y 2) el rompimiento de enlaces peptídicos que es una consecuencia negativa ya que se reduce el peso molecular desestabilizando la estructura secundaria, (Bailey A, 1968). La eventualidad de estos efectos depende del microambiente en el que se encuentre la colágena y de la dosis de irradiación.

El Fibroquel<sup>MR</sup>, nombre comercial que recibe la mezcla colágena y polivinilpirrolidona, es un líquido viscoso preparado a base de colágena “nativa” (sin tratamiento alguno) obtenida de la piel de porcino, en solución amortiguadora de citratos, y polivinilpirrolidona. Este biomaterial es una colágena polimerizada inyectable con propiedades inmunomoduladoras. El copolímero, debido a sus propiedades hemostáticas y cicatrizantes, se usa en el tratamiento de pérdidas cutáneas, úlceras, quemaduras de segundo y tercer grado, áreas donadoras de injertos, heridas, raspones y abrasiones, así como en los sitios de sutura. Debido a sus efectos antifibróticos, se utiliza también en la prevención de la recidiva de la cicatriz hipertrófica y queuloide posterior a la resección. Los estudios in vivo

---

(Furuzawa J, et al., 2003), han mostrado que el copolímero (CLG-PVP) modula el proceso inflamatorio crónico de la fibrosis al disminuir factores proinflamatorios.

Al ponerse en contacto con los tejidos, el copolímero CLG-PVP crea una capa protectora sobre áreas cruentas, siendo inductor de la cicatrización favorece una rápida epitelización.

Dada la fuente de obtención de la colágena tipo I empleada en el copolímero, su antigenicidad baja y la homología que existe entre la colágena porcina tipo I y la colágena humana (Paradis K, et al., 1999), se considera un material inocuo, excepto en personas que manifiesten hipersensibilidad a ella. El copolímero no produce reacciones antigénicas y su uso como inductor farmacológico en humanos es seguro además de que ha sido aprobado por la agencia de alimentos y medicamentos (FDA) de los Estados Unidos, (Penilla I, et al., 2008).

La mezcla colágena-PVP es estable para diferentes concentraciones de colágena y se puede aplicar en diferentes tratamientos; sin embargo, no se han establecido cuáles son las interacciones entre la colágena y la PVP que le dan esta estabilidad. Así, se plantea estudiar la interacción del copolímero resultante de la mezcla colágena porcina tipo I y polivinilpirrolidona. La caracterización del sistema colágena-PVP por las técnicas de electroforesis capilar, microscopía electrónica, espectroscopias de Infrarrojo y de resonancia magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , en complemento con un análisis térmico, debería explicar sus propiedades fisicoquímicas.

---

## **II. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Estudiar fisicoquímicamente al copolímero formado entre la colágena tipo I y la polivinilpirrolidona (PVP) a fin de elucidar las interacciones entre los dos polímeros.

### **Objetivos específicos**

- Preparar la solución del copolímero estable de colágena-PVP.
- Analizar la estabilidad del copolímero CLG-PVP, aplicando las técnicas espectroscópicas y fisicoquímicas para identificar los grupos funcionales que interactúan de la colágena y la PVP.
- Analizar la estabilidad del copolímero en función de la temperatura.

---

### **III. HIPÓTESIS**

1. Los grupos polares de la colágena y la polivinilpirrolidona interaccionan fuertemente en el copolímero estabilizando y cambiando la rigidez de su estructura.
2. La radiación gamma cambia las propiedades fisicoquímicas del biomaterial induciendo la formación de un nuevo copolímero.

---

## IV. ANTECEDENTES

### IV.1 Colágena

Los biomateriales son materiales que interactúan con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo humano (Black J, 1999). Las condiciones que debe cumplir un biomaterial son biodegradabilidad y biocompatibilidad.

La colágena se considera como biomaterial debido a sus propiedades cicatrizantes, regenerativas, etc. Es un biopolímero presente en el cuerpo humano. En el campo de la medicina, éste polímero se aplica en soluciones inyectables y dispersiones, para la regeneración tisular, remodelación de piel y tejido, además de que sirve como vehículo para la liberación de fármacos.

La colágena es un excelente biomaterial debido a las siguientes características:

- Biológicamente, es biodegradable, promueve el crecimiento celular debido a su capacidad de interactuar con diversas células y macromoléculas.
- Físicoquímicamente, tiene la habilidad para reticularse con diversos agentes (detergentes, agentes reductores y agentes caotrópicos) que proporcionan cambios controlados y predecibles en su solubilidad, además de su velocidad de degradación.
- Físicamente, posee alta resistencia a la tracción debido a su morfología fibrilar, promueve la orientación y entramado del biomaterial.

La colágena se encuentra comercialmente disponible en tres formas: colágena soluble nativa, colágena procesada enzimáticamente y colágena hidrolizada.

La colágena, para crear formadores de implantes bioequivalentes, se ha mezclado con PVP y también con polietileno de alta densidad (PEAD) (González R, et al., 2007), con polimetilmetacrilato, con hidroxiapatita, con quitosano (Lie M, et al., 2003), polivinilalcohol (Sionkowska A, et al., 2009) y con propilenglicol. En este último caso, la

---

mezcla resultó ser una cera antiséptica bioabsorbente. Sin embargo, cualquier implante bioequivalente, debe mimetizar las características fisicoquímicas del tejido receptor.

### **Estructura de la colágena**

La colágena es la proteína fibrosa principal, insoluble en la matriz extracelular del tejido conectivo, y la más abundante en el reino animal. Hasta ahora se han identificado 42 cadenas polipeptídicas distintas, las cuales están codificadas por 41 genes específicos y componen 27 tipos de colágena distintas.

La base molecular de la colágena está constituida por cadenas de polipéptidos y cada uno de éstos es un polímero de aminoácidos. Es decir, las cadenas de aminoácidos forman unidades moleculares pequeñas. Existen alrededor de 20 aminoácidos fundamentales y su secuencia permite identificar las cadenas de polipéptidos. Las proteínas se identifican por poseer una secuencia particular de aminoácidos que es única y propia de esa proteína que permite identificarla por métodos bioquímicos, inmunológicos, etc.

La colágena está constituida por tres cadenas de polipéptidos entrelazadas, formando una triple hélice, que a su vez forma una unidad macromolecular denominada tropocolágeno. Estas macromoléculas de tropocolágeno, de aproximadamente 300 nm, se agrupan entre sí formando estructuras llamadas fibrillas de colágena.

En el cuerpo humano, aproximadamente el 7 % de su peso total es colágena, de la cual, entre el 80 y 90 % de la colágena está constituida por colágena tipo I, II y III. La colágena se encuentra en todos los tejidos y órganos a los que proporciona el armazón que les da forma y resistencia estructural. La elevada concentración de colágena en todos los órganos pone de manifiesto su importancia; el porcentaje de colágena en peso varía en tejidos y órganos representativos, por ejemplo, es del 4% en el hígado, 10% en el pulmón, 12-24% en la aorta, 50% en el cartílago, 64% en la córnea, 23% en el hueso cortical entero y 74% en la piel (Devlin T., 2004).

---

*Colágena tipo I:* Se encuentra abundantemente en la dermis, el hueso, el tendón, la dentina y la córnea. La unidad fundamental estructural de la colágena tipo I (tropocolágeno) es larga (300 nm) y delgada (1.5 nm), su estructura es una triple hélice conformada por tres cadenas en espiral: dos cadenas  $\alpha_1$  (I) idénticas y una cadena  $\alpha_2$  (I). Estas cadenas difieren ligeramente en el número de sus aminoácidos y en su secuencia. Su función principal es la resistencia al estiramiento.

Las propiedades fisicoquímicas que diferencian a cada tipo de colágena se deben, principalmente, a la secuencia de los aminoácidos que forman las cadenas  $\alpha$ . La biosíntesis de la colágena sigue los principios básicos de la biosíntesis de proteínas, figura 2. En el núcleo de la proteína se transcribe el ARN del ácido desoxirribonucleico (ADN) y las cadenas polipeptídicas se sintetizan en los complejos ribosomales que contienen al ARN. En la biosíntesis ribosomal, la OHPro y OHLis (hidroxilisina) no se incorporan directamente en las cadenas polipeptídicas, sino que son derivados de Pro y Lis que se hidroxilan solamente después de que han sido incorporados por uniones peptídicas. Las cadenas polipeptídicas sintetizadas inicialmente son cadenas pro  $\alpha$ , debido a que las extensiones peptídicas en sus extremos son aproximadamente 40-50 % más grandes que en las cadenas  $\alpha$ , esas extensiones difieren en la composición de aminoácidos de región colagénica.

La estructura de la colágena a su vez, se divide en dos segmentos: la parte central (helicoidal) y la parte terminal (extremos) conocida como telopéptido correspondiente a la cadena (N-terminal y C-terminal). Las cadenas  $\alpha_1$  (I) están conformadas por una secuencia de 1052 aminoácidos de los cuales 1011 corresponden a la parte central, 16 al extremo N-terminal y 25 al extremo C-terminal, mientras que la cadena  $\alpha_2$  (I) está formada por 1029 residuos aminoácidos. Mientras las regiones amino terminal de las cadenas pro  $\alpha$  entran en la cisterna del retículo endoplasmático rugoso (RER), ellas se encuentran aparentemente unidas a la o las proteasas que eliminan a la secuencia señal

(secuencias que actúan como señales de destino intracelular), y también se encuentran con las tres enzimas hidroxilasas que convierten los residuos de Pro y Lis en 3-OHPro, 4-OHPro y OHLis.

Las reacciones de hidroxilación se catalizan por las hidroxilasas involucrando el uso de cofactores como  $Fe^{+3}$ ,  $O_2$ ,  $\alpha$ -cetoglutarato y el ácido ascórbico como agente reductor. Se sintetiza por fibroblastos, condroblastos y osteoblastos.

La secuencia mínima requerida para la interacción de la prolil-hidroxilasa es un triplete  $-X-Pro-Gli-$ , donde X puede ser cualquier aminoácido. Sin embargo, la hidroxilación del residuo propil en esta secuencia está influenciado por factores que incluyen: la longitud de la cadena del péptido sustrato, la naturaleza del aminoácido de la posición -X- del triplete y la naturaleza de los aminoácidos en otros tripletes. La conformación del péptido sustrato tiene un marcado efecto, mientras que la conformación de la triple hélice previene completamente la hidroxilación de los residuos proliolo.

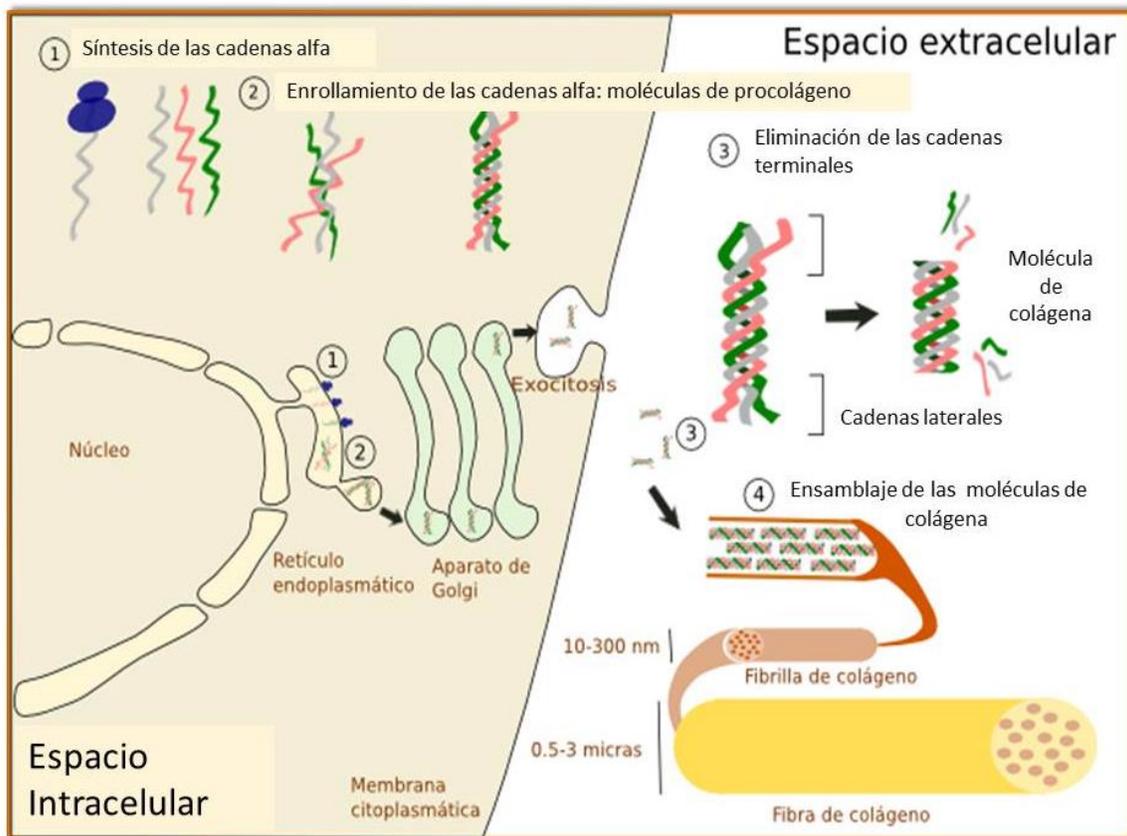


Figura 2. Biosíntesis de la colágena.

---

La colágena tipo I está constituida por un conjunto de tres cadenas polipeptídicas agrupadas en una estructura helicoidal. La repetición de 333 tripletes en la secuencia Gli-X-Y conduce a la estructura de cada una de las cadenas, figura 3.

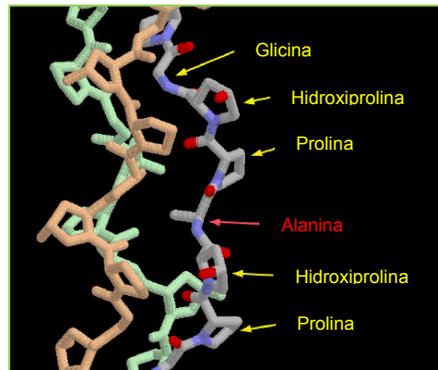


Figura 3. Estructura de la triple hélice de la colágena.

La glicina constituye la tercera parte de los aminoácidos de cada cadena; la prolina, en la mayoría de los casos, se encuentra en la posición X; la hidroxiprolina y la hidroxilisina se encuentran en la posición Y. Estos dos aminoácidos no abundan en la constitución de otras proteínas del cuerpo humano. Las tres cadenas se enrollan y se fijan mediante enlaces transversales, para formar una triple hélice dextrógira con una distancia entre las vueltas de 8.6 nm.

La estabilidad de la estructura helicoidal se debe a los puentes de hidrógeno que se forman entre las cadenas  $\alpha$  que componen la triple hélice. Específicamente, el enlace de hidrógeno se forma entre el grupo amino de la glicina y los grupos carbonilos o los grupos hidroxilo de la hidroxiprolina, figura 4. La dirección de los puentes de hidrógeno es transversal al eje de la molécula de colágena (Lodish H, et al., 2000). La hidroxilación de la prolina hace termoestable a la proteína, mientras que la hidroxilación de la lisina permite el entrecruzamiento de varias triples hélices.

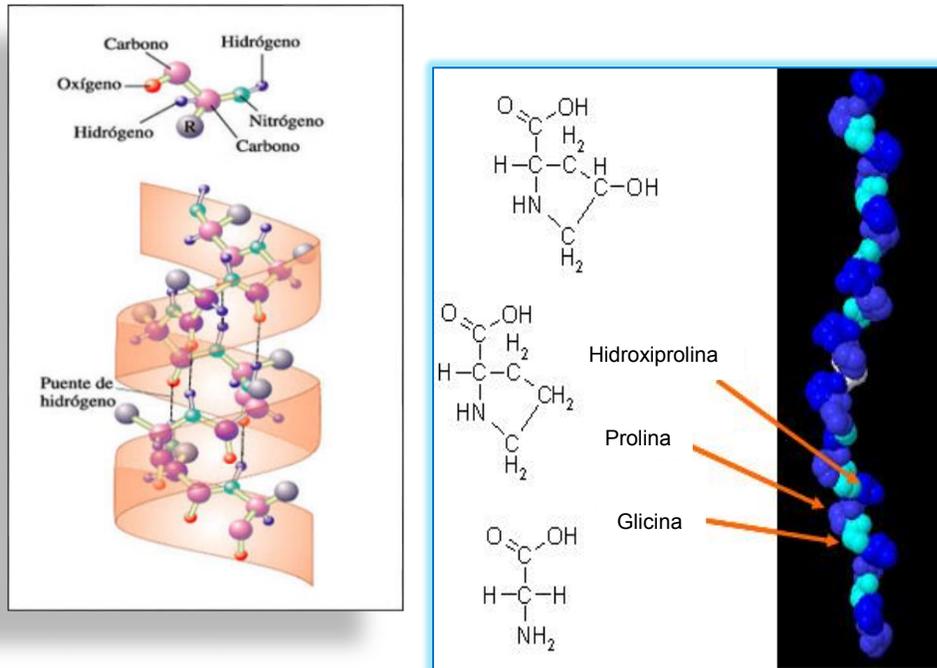


Figura 4. Puentes de hidrógeno en las cadenas de la colágena.

*Colágena tipo II:* Se encuentra principalmente en el cartílago, pero también está presente en la piel, vasos sanguíneos, intestino, la córnea embrionaria y en la notocorda, en el núcleo pulposo y en el humor vítreo del ojo. En el cartílago forma fibrillas finas de 10 a 20 nm, pero en otros microambientes puede formar fibrillas más grandes, indistinguibles morfológicamente del colágeno tipo I. Está constituida por tres cadenas  $\alpha 2$  de un único tipo. Se sintetiza por el condroblasto y su función principal es la resistencia a los cambios de presión. A diferencia del tipo I, la colágena tipo II contiene 9 veces más carbohidratos unidos a la hidroxilisina, pero es menos estable a la temperatura. El colágeno de tipo II se encuentra casi exclusivamente en el cartílago, donde la presencia de colágenos menores adicionales y glicoproteínas no colágenas es crucial para la modulación de diámetro de fibrillas, propiedades superficiales, y las interacciones interfibrilares.

*Colágena tipo III:* Abunda en el tejido conjuntivo laxo, en las paredes de los vasos sanguíneos, la dermis de la piel y el estroma de varias glándulas. Es un constituyente importante de las fibras de 50 nm que se han llamado

---

tradicionalmente fibras reticulares. Está constituida por tres cadenas idénticas  $\alpha 1$  (III), se caracteriza por una disposición de aminoácidos donde predomina la hidroxiprolina y donde además aparece la cistina, un aminoácido que no es común en otro tipo de colágena. La longitud de la triple hélice en la colágena tipo III es ligeramente más larga que la colágena tipo I, en contraste, los telopéptidos son un poco más cortos (Cameron et al., 2002). La colágena tipo III se sintetiza por las células del músculo liso, fibroblastos y glía. Su función es la de sostén de los órganos expandibles.

## **IV.2 Polivinilpirrolidona**

El polímero polivinilpirrolidona (PVP), es un polvo blanco, higroscópico con un débil olor característico. En contraste con la mayoría de los polímeros, es fácilmente soluble en agua y un gran número de disolventes orgánicos tales como alcoholes, aminas, ácidos, hidrocarburos clorados, amidas y lactamas (lactona+amida). Por otro lado, el polímero es insoluble en los ésteres comunes, éteres, hidrocarburos y cetonas. La PVP se sintetiza vía polimerización por radicales libres de N-vinilpirrolidona en agua o alcohol con un iniciador adecuado, figura 5, por reacción de acetileno (síntesis de Reppe) con formaldehído se obtiene 4-butanodiol que se hidrogena a butanodiol. Después de la ciclación oxidativa de butirolactona y su reacción con amoníaco, la pirrolidona se forma por la eliminación de agua. Por último, el grupo vinilo se introduce para formar N-vinilpirrolidona-2(1-(2-oxo-pirrolidinil)-etileno. Mediante la selección adecuada de las condiciones de polimerización, se puede conseguir una amplia gama de pesos moleculares que se extiende desde valores bajos como 9000 Da a aproximadamente 2.2 millones de Da. Generalmente, la vinilpirrolidona se polimeriza en solución acuosa usando peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como iniciador, la concentración de éste, controla el peso molecular. Los radicales hidroxí en solución acuosa son generados por el peróxido de hidrógeno, así mismo la formación de los grupos terminales del polímero. En la mayoría de los casos, el grupo funcional del aldehído (R-CHO) se encuentra como el segundo

grupo terminal, esto puede explicar el hecho de que el segundo grupo terminal hidroxilo que se forma durante la formación de la cadena, continúe reaccionando separando la pirrolidona. Debido a su hidrofiliidad, no-toxicidad y facilidad para formar complejos, se utiliza en diferentes áreas: en medicina por ejemplo, se utiliza como sustituto del plasma de la sangre para prolongar el efecto del medicamento; la PVP añadida al yodo, forma un complejo llamado povidona yodada que posee propiedades desinfectantes; se utiliza como ligante en muchos comprimidos farmacéuticos, además de su aplicación en la industria alimenticia, textil y farmacéutica. Es un polímero lineal no iónico, higroscópico, muy polar; aceptor de protones, compatible con diferentes resinas.

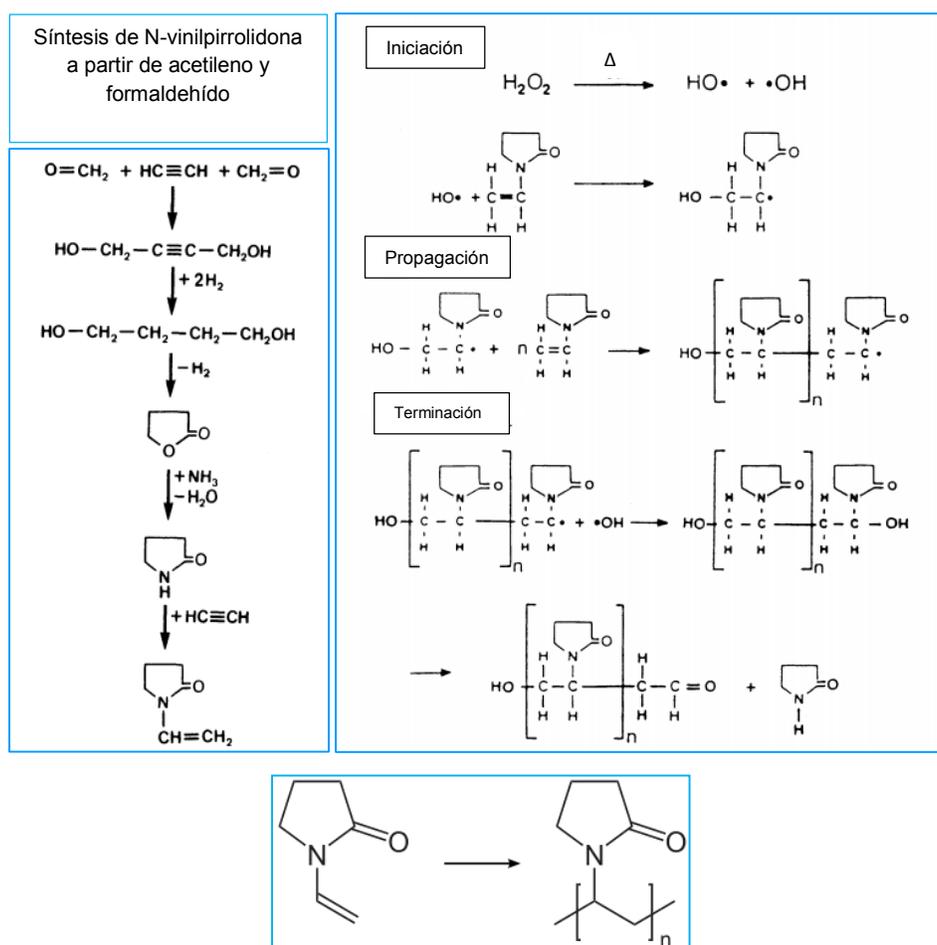


Figura 5. Mecanismo de polimerización de la PVP en solución acuosa.

---

La exposición a altas temperaturas debe evitarse, aún cuando la PVP en polvo es muy estable al calor. El polímero parece ser muy estable cuando se calienta repetidamente a 110-130°C durante intervalos relativamente cortos, sin embargo, el oscurecimiento del color y la disminución de la solubilidad en agua son evidentes al calentarla en aire a 150°C. La PVP acuosa es estable durante largos períodos de tiempo si se protege del moho. Los conservadores habituales como el ácido benzoico, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico son muy eficaces. Por otro lado, debe realizarse una prueba adecuada con productos acabados que contengan PVP antes de decidir sobre un conservador. La esterilización por vapor (15 lb de presión durante 15 min) también se puede utilizar, este tratamiento no parece cambiar las propiedades de las soluciones. El polímero no tiene poder de amortiguamiento, debido a que se observan grandes cambios en el pH de las soluciones al agregar pequeñas cantidades de ácidos o bases.

La PVP (plasdone, marca ISP) también tiene aplicaciones técnicas, como adhesivo, como un aditivo especial para pilas, como aglomerante, dispersante y modificador de viscosidad en cerámica, fibra de vidrio y tintas, como emulsionante, como agente espesante en geles de blanqueamiento dental, como agente para aumentar la solubilidad de los fármacos en forma de dosificador líquido y semi-líquido (jarabes, cápsulas de gelatina blanda).

### **IV.3 Copolímero CLG-PVP**

A la mezcla de colágena nativa y PVP (CLG+PVP) expuesta a una dosis de irradiación gamma de 12 kGy se le ha llamado CLG-PVP (Fibroquel<sup>MR</sup>). Los estudios in vitro sugieren que el copolímero colágena-PVP actúa a nivel de fibroblastos y macrófagos, modulando el metabolismo de la colágena, participando así en los procesos regenerativos con una mejor calidad y tiempo de respuesta en la cicatrización. Por otra parte, los estudios in vivo han mostrado que la colágena-PVP modula el proceso inflamatorio crónico de la fibrosis al disminuir factores proinflamatorios hasta alcanzar niveles normales, lo que favorece el reemplazo de

---

los componentes del tejido conjuntivo con la consecuente eliminación del exceso de proteínas fibrosas.

Al ponerse en contacto con los tejidos, la colágena-PVP crea una capa protectora sobre áreas cruentas, promoviendo la cicatrización y favoreciendo una rápida epitelización.

Gracias al éxito que tiene el copolímero CLG-PVP y su aplicación en medicina se planteó en esta tesis, identificar los grupos funcionales que interactúan en la mezcla irradiada de colágena con polivinilpirrolidona. Para esto, se utilizarán las técnicas de caracterización de electroforesis en gel de poliacrilamida, espectroscopia de infrarrojo FTIR, resonancia magnética nuclear RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en estado líquido y sólido respectivamente, microscopía electrónica SEM y AFM en complemento con un análisis térmico por DSC.

## **V. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

### **V.1 Materiales**

La colágena nativa tipo I, extraída de la piel de porcino 1% p/v en una solución de citratos 5mM, y la polivinilpirrolidona 99.5% p/v (K-15; ISP) en estado sólido, fueron donadas por la empresa Aspid S.A. de C.V., México DF.

#### **V.1.1 Colágena-nativa**

##### **a) Diálisis**

Una solución de colágena tipo I 1% en agua, en presencia de una mínima cantidad de ácido cítrico, se dializó con ácido acético 5 mM en una cámara fría a 4°C. Una vez dializada, se filtró y manteniéndose estéril, se cuantificó la hidroxiprolina (OHPro) y consecuentemente la colágena en la muestra.

##### **b) Determinación de la concentración de hidroxiprolina**

El método empleado para la determinación de OHPro en las muestras de colágena (CLG), CLG+PVP y CLG-PVP fue el de J. F Woessner (Woessner

---

J.F., 1961), en donde una alícuota de 200  $\mu$ l de la muestra disuelta en ácido cítrico, se colocó en una ampolleta con 800  $\mu$ l de HCl 6 N. La ampolleta se selló y se hidrolizó a 105°C por 18 h para obtener a los aminoácidos libres y poder determinar la cantidad de OHPro contenida en la muestra.

- ♣ La alícuota evaporada de la ampolleta se suspendió en 200  $\mu$ l de NaCl 0.2 M en un matraz aforado de 10 ml.
- ♣ Por adición de NaOH o HCl se ajustó el pH a un valor de 7 y se aforó con NaCl 0.2 M.
- ♣ De la solución que se neutralizó se tomó una alícuota de 200  $\mu$ l y se colocó en un tubo de ensayo con tapa de rosca, se le adicionó NaCl 0.2M aforándose a 1ml.
- ♣ Se agregó 500  $\mu$ l de reactivo cloramina-T para iniciar la oxidación de la OHPro. Se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente.
- ♣ Para eliminar la cloramina-T, se agregó 500  $\mu$ l de ácido perclórico 3.15 M y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.
- ♣ Se agregó 500  $\mu$ l de p-dimetilaminobenzaldehído 20% para acomplejar el pirrol formado de la oxidación de la hidroxiprolina.
- ♣ Se agitó e incubó por 20 minutos a 60°C, coloreándose entonces la muestra.
- ♣ Las soluciones se prepararon por triplicado para calcular la incertidumbre en las medidas de absorbancia.
- ♣ La absorbancia a 557 nm de cada solución se midió en un espectrofotómetro UV-visible Beckman D0780 con una resolución de 2 nm.
- ♣ Las concentraciones de OHPro en la colágena de cada muestra se determinaron directamente de la curva de calibración mediante interpolación.

Para construir la curva de calibración se prepararon soluciones de OHPro con NaCl 0.2 M, cloramina-T, ácido perclórico 3.15 M y p-dimetil-aminobenzalehído 20% v/v, variando la concentración de hidroxiprolina (diluida en HCl 0.01 N) de

---

200 a 800 µg/ml. Se graficó la absorbancia de OHPro en función de la concentración.

La concentración de OHPro se determinó aplicando la ley de Beer-Lambert (Atkins P, De Paula J, 2006).

$$A = \epsilon \lambda C$$

Donde

A= absorbancia

$\epsilon$ = coeficiente de extinción molar del cromóforo

$\lambda$ = distancia que recorre el haz en la muestra

C= concentración de la sustancia que contiene al cromóforo.

#### c) Determinación de la concentración de la colágena

La colágena tipo I se caracteriza por la secuencia repetitiva Gli-X-Y y la alta concentración que tiene en glicina (33 ±1.3 %), la prolina y la hidroxiprolina constituyen el 22 %. El contenido de hidroxiprolina es multiplicado por 7.46, basado en que el 13.4 % de toda la colágena es hidroxiprolina.

El porcentaje de colágena está dada por:

$$\% CLG = \frac{(\mu g \text{ de hidroxiprolina})(7.46)(1000)}{(mg \text{ de muestra})(\mu l \text{ alícuota})}$$

La formación del cromógeno disminuye cuando la concentración del cloruro de sodio en las muestras supera los 0.4 M.

### V.1.2 PVP

#### a) Disolución

En una solución acuosa en presencia de una mínima cantidad de ácido (0.54 mg/ml) cítrico se disolvió la PVP (8000 Da; ISP Investments, Inc.) necesaria para obtener una concentración final de 133 mg/ml.

---

### **V.1.3 PVP irradiada (PVP-γ)**

Una solución de pvp 133 mg/ml, se irradió en un contenedor de aluminio en un irradiador industrial JS-6500 que utiliza una fuente gamma de cobalto-60. Se mantuvo una dosis entre 12.14 y 12.02 kGy con tiempo de consola de 122 segundos. Esta irradiación se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Nabor Carrillo (ININ).

### **V.1.4 Colágena + polivinilpirrolidona (CLG+PVP)**

Una solución de colágena-n tipo I al 1% (en una solución de citratos) se mezcló con pvp, en relación másica 1:16. Se dializó con ácido acético 5 mM en una cámara fría a 4°C y se cuantificó la colágena como descrito en III.1.1 b.

### **V.1.5 CLG-PVP**

La solución en relación 1:16 de CLG+PVP en citrato, se irradió como antes descrito en III.1.3. Esta muestra se etiquetó como CLG-PVP.

La mezcla irradiada se dializó con ácido acético 5 mM en una cámara fría a 4°C y se cuantificó la colágena como descrito en III.1.1 b.

## **V.2 CARACTERIZACIÓN**

Las muestras se caracterizaron por electroforesis capilar, espectroscopia de infrarrojo (FTIR), resonancia magnética nuclear (RMN) de líquidos <sup>1</sup>H y sólidos (MAS) de <sup>13</sup>C, microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de fuerza atómica (ATM) y calorimetría diferencial de barrido DSC. Algunas muestras se caracterizaron en forma líquida diluidas en agua (5 mg/ml), otras muestras se caracterizaron en estado sólido y para ello se liofilizaron como se describe más adelante.

### **V.2.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida**

La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico a través de una matriz porosa, la cual

las separa por tamaños moleculares y carga eléctrica. El campo eléctrico aplicado fue de 30 mA, no puede ser muy alto porque se generaría una temperatura muy alta, tampoco se recomienda un campo más bajo ya que se obtendría una separación muy pobre a causa de la difusión por tiempo prolongado de la corrida electroforética. La carga neta de la partícula está dada por el pH del medio y puede modificarse por la interacción con pequeñas moléculas de iones u otras macromoléculas.

### V.2.1.1 Corrida electroforética, preparación del gel de acrilamida.

Primero se preparó el gel separador con los reactivos que muestra la tabla 2, con agitación constante y se colocó entre los vidrios que sirvieron como molde para la formación de los geles en estado líquido, se agregó agua lentamente por las paredes del vidrio que contenía el gel concentrador para evitar la formación de burbujas de aire.

Reactivos	Gel separador	Gel concentrador
<b>Acrilamida [C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NO]</b>	2.5 ml	0.65 µl
<b>Amortiguador Tris</b>	pH=8.8, 2.5 ml	pH=6.8, 1.25ml
<b>SDS 10% [NaC<sub>12</sub>H<sub>25</sub>SO<sub>4</sub>]</b>	100.3 µl	100 µl
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	2.8 ml	3 ml
<b>Persulfato de amonio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]</b>	22.3 µl	25 µl
<b>Temed [C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>]</b>	11.15 µl	5 µl

Tabla 2. Reactivos utilizados en la preparación del gel de acrilamida.

Una vez que se formó el gel separador se preparó el gel concentrador con los reactivos que muestra la tabla 2, retirando previamente el agua que estaba sobre el gel separador, se colocó el aditamento para formar los carriles y se vertió la solución del gel concentrador.

Después de haberse formado el gel concentrador, se colocó la base de vidrio que contenía el gel dentro de la caja electroforética donde se vertió el amortiguador de corrida (que contenía ácido cítrico, ácido acético glacial, acetato de sodio trihidratado, hidróxido de sodio y agua destilada) para evitar que se secase el gel. Las muestras de colágena se mezclaron con amortiguador de corrida (con

---

indicador) y fueron llevadas a ebullición por 5 min para desnaturalizar a la proteína y observarse en el gel las diferentes cadenas que la componen. Alícuotas de 20  $\mu\text{L}$  se corrieron por electroforesis en gel de poliacrilamida con un sistema de amortiguador discontinuo. Se cerró la caja y se conectó a una fuente de poder a 30 mA, una vez terminada la corrida electroforética se procedió a separar los geles para llevar a desteñir el gel separador.

### **V.2.2 Espectrometría FTIR.**

Se adquirieron los espectros FTIR en la ventana espectral de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  a fin de identificar los grupos funcionales de las muestras. Se usó un espectrofotómetro Thermo Electron Nicolet FT-IR 6700 con resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Los principios y aplicaciones detalladas de FT-IR (Griffiths and Heseth, 2007) han sido ampliamente presentados en otros trabajos de investigación.

### **V.2.3 Resonancia Magnética Nuclear, RMN.**

Los espectros  $^1\text{H}$  RMN en estado líquido se adquirieron en un espectrofotómetro Bruker Avance 400, a una frecuencia de resonancia de 400.17 MHz en la ventana espectral de -1.5-12.10 ppm. Se usó agua deuterada como disolvente ( $\text{D}_2\text{O}$ ). Los espectros se adquirieron en la modalidad de supresión de agua.

Previo a adquirir los espectros de  $^{13}\text{C}$  CP MAS RMN en estado sólido, las muestras se liofilizaron en un liofilizador Labconco Freezone 6, iniciando con la congelación de las muestras a una temperatura de  $-40^\circ\text{C}$  por 3 horas y el secado (donde se sublima el agua) a una presión de  $90 \times 10^{-3}$  mbar por 18 horas.

Los espectros  $^{13}\text{C}$  CP MAS RMN en estado sólido se adquirieron en un espectrómetro Bruker Avance II 300, a una frecuencia de resonancia de 75.4 MHz, y una frecuencia de giro al ángulo mágico de 5 kHz. Las condiciones típicas de  $^{13}\text{C}$  CP MAS RMN en los experimentos de polarización de  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  que se usaron fueron: pulso a  $\pi/2$  de 4  $\mu\text{s}$  y pulsos de contacto de 100  $\mu\text{s}$ , 1 ms, 3 ms y 5 ms en la ventana espectral de -50 a 275 ppm.

---

#### **V.2.4 Microscopía electrónica, SEM y AFM.**

La microscopía electrónica de barrido (SEM) se utilizó para la caracterización de la morfología de las muestras. Las micrografías se adquirieron en un equipo JEOL JEM-7600F emisión de campo con resolución de 1 nm.

La microscopía de fuerza atómica se utilizó para la caracterización de superficies en cuanto a su relieve, textura y rugosidad. Las imágenes AFM se adquirieron en un microscopio JSPM JEOL en modo de operación de contacto intermitente. La frecuencia de vibración del cantiléver fue en el rango de 350 kHz.

Todos los análisis se llevaron a cabo a temperatura ambiente (25 °C).

#### **V.2.5 Calorimetría diferencial de barrido, DSC.**

Los termogramas se adquirieron en un equipo DSC Q10 utilizando soportes de muestras herméticamente cerrados. La calibración del equipo se realizó con el elemento Indio y una línea base con charolas vacías. La velocidad de calentamiento fue de 10 °C/min para las muestras en solución y 1 °C/min para las muestras liofilizadas, en un rango de 0 a 200 °C y un flujo de nitrógeno de 50 mL/min. Cada análisis se realizó por triplicado con una sola exploración. Los cambios de entalpía se determinaron a partir de los datos experimentales.

Las muestras bajo estudio son CLG, CLG+PVP, CLG-PVP, CLG-PVP/SE, PVP y PVP- $\gamma$ .

---

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VI.1 Determinación de la concentración de colágena.

Para caracterizar el tipo de colágena se utilizó la electroforesis en gel de poliacrilamida. Para ello se calculó primero la concentración de hidroxiprolina en la colágena por el método de Woessner, considerando que [ $\mu\text{g Colágena} = \mu\text{g OHPro} \times 7.46$ ] entonces se calculó el % de colágena según la relación siguiente.

$$\% \text{ CLG} = \frac{(\mu\text{g de hidroxiprolina})(7.46)(1000)}{(\text{mg de muestra})(\mu\text{l alícuota})}$$

Los resultados de la concentración de OHPro y de la colágena en cada muestra se reportan en la tabla 3.

muestra	$\mu\text{g OH-Pro}$	Colágena [mg/ml]
Colágena control	6.2	10
Colágena nativa	5.79	9.15
CLG+PVP	3.56	5.67
CLG-PVP	2.91	5.04

Tabla 3. Concentración de colágena en las muestras bajo estudio.

### VI.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida.

El gel de poliacrilamida en el cual se corrieron las muestras de colágena y CLG-PVP en alícuotas de 20  $\mu\text{L}$ , muestran un patrón de bandas muy similar, figura 6.

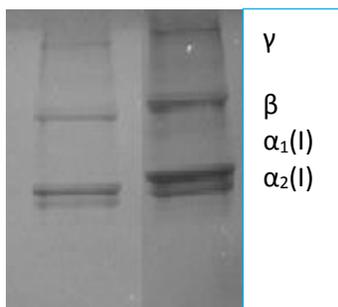


Figura 6. Imagen del gel de poliacrilamida con las muestras de colágena (carril izquierdo) y el copolímero CLG-PVP (carril derecho) en condiciones de desnaturalización.

---

Las bandas  $\alpha$  representan a los monómeros de la colágena, mientras que la banda  $\beta$  representan a los dímeros y la banda  $\gamma$  a los trímeros de las cadenas  $\alpha$ . La banda de la cadena  $\alpha_1$  (I) es más intensa que la de  $\alpha_2$  (I) debido a que la colágena tipo I es un heterotrímero formado por tres cadenas polipeptídicas denominadas cadenas alfa, dos cadenas alfa idénticas  $\alpha_1$  (I) y una cadena alfa diferente  $\alpha_2$  (I), estas tres cadenas se entrecruzan sobre sí mismas formando una superhélice con una longitud de 300 nm, un diámetro de 1.5 nm y un peso molecular de 300 kDa. Así se confirma que la colágena es de tipo I. Los carriles de las muestras, no presentan bandas de degradación por debajo de la cadena  $\alpha_2$  (I) esto nos indica que las muestras de colágena que se corrieron contienen únicamente colágena tipo I.

### VI.3 Espectroscopía IR

La figura 7 incluye los espectros FTIR de colágena (CLG), PVP, PVP irradiada (PVP- $\gamma$ ), CLG+PVP y CLG-PVP, en estado líquido. Los espectros muestran dos bandas de absorción intensas, la primera muy ancha de 3200 a 3500  $\text{cm}^{-1}$  y que se atribuye a la vibración de elongación del enlace OH ( $\nu$ ) y la segunda se debe a la deformación en el plano de la molécula del agua ( $\delta_{\text{H}_2\text{O}}$ ). Nótese que las bandas propias de los grupos funcionales de la colágena no se resuelven. Por ejemplo, en la ventana espectral de 1620-1650  $\text{cm}^{-1}$  se esperaría la banda de absorción de la vibración debida al grupo amida primaria de la colágena. También están ausentes las bandas debidas a los enlaces  $\text{CH}_3$  que se esperan apenas por debajo de 3000  $\text{cm}^{-1}$ . En cambio, la PVP muestra dos señales poco intensas en la ventana espectral de 1475 a 1425  $\text{cm}^{-1}$  atribuidas a la vibración de deformación del  $-\text{CH}_2-$  ( $\delta$ ) y a 1286  $\text{cm}^{-1}$  debida a la vibración de tensión simétrica del enlace C-N (Dumitrascu M, 2011) y que también aparecen en las muestras de CLG+PVP, CLG-PVP y PVP- $\gamma$ .

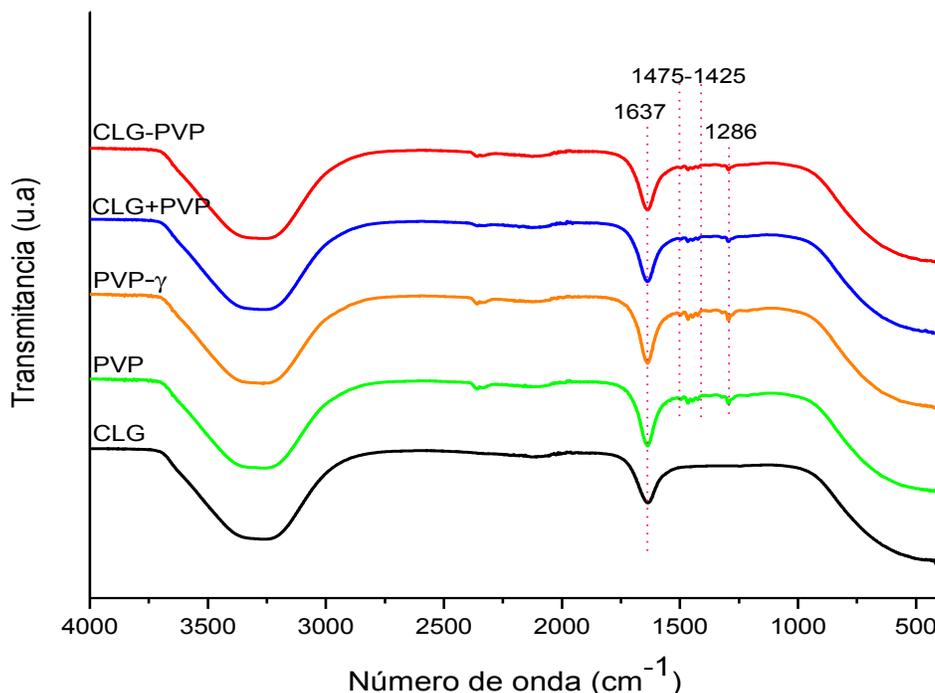


Figura 7. Espectros FTIR de las muestras en estado líquido con resolución de  $4\text{cm}^{-1}$  a temperatura ambiente.

Evidentemente, la no resolución de estas bandas se debe a que la colágena está en solución a baja concentración y las bandas del agua son muy intensas. Así, se prefirió liofilizar las muestras y se adquirieron los espectros en estado sólido.

En la figura 8 se incluyen los espectros de las muestras de CLG, PVP, PVP- $\gamma$ , CLG+PVP y CLG-PVP, en estado sólido. El espectro de colágena presenta una banda de absorción característica de una amida primaria en  $1633\text{ cm}^{-1}$  que resulta de la vibración de tensión del grupo carbonilo, una banda de una amida secundaria a  $1545\text{ cm}^{-1}$ , estas bandas están atribuidas a los enlaces peptídicos de la colágena y un conjunto de tres bandas de absorción más débiles con modos de vibración centradas a  $1234\text{ cm}^{-1}$  atribuidas a una amida terciaria (Paine k, Veis A 1988). La banda ancha de absorción entre  $3200$  y  $3500\text{ cm}^{-1}$  es una contribución tanto de los grupos OH como de los NH y la banda poco intensa a  $3050\text{ cm}^{-1}$  al sobretono del carbonilo, mientras que la banda ancha de  $3000$  a  $2850\text{ cm}^{-1}$  se

---

debe a la elongación C-H de los grupos CH<sub>3</sub> y/o CH<sub>2</sub>. Cabe mencionar que se ha reportado la región de absorción de la prolina en la amida primaria a 1632 cm<sup>-1</sup>.

El espectro de PVP, presenta las bandas de absorción de 3500 a 3200 cm<sup>-1</sup> que se atribuye a la vibración de elongación del OH ( $\nu$ ) y a 3300 cm<sup>-1</sup> la banda de absorción del NH, de 2975 a 2760 cm<sup>-1</sup> a la vibración de tensión simétrica del -CH<sub>2</sub>- ( $\nu$ ), a 1650 cm<sup>-1</sup> se observa la banda que se atribuye a la vibración de tensión del (C=O) de 1445 a 1400 cm<sup>-1</sup>, se le atribuye a la deformación del -CH<sub>2</sub>- ( $\delta$ ), también se observa la vibración del enlace C-N a 1286 cm<sup>-1</sup> y de 730 a 710 cm<sup>-1</sup> que se atribuye al balanceo del -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-. El -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- también tiene bandas de flexión a 1300 cm<sup>-1</sup>. Los espectros de sólidos como la PVP con cadenas largas y grupos polares terminales (amidas, ácidos) muestra bandas de absorción entre 1350 y 1180 cm<sup>-1</sup>.

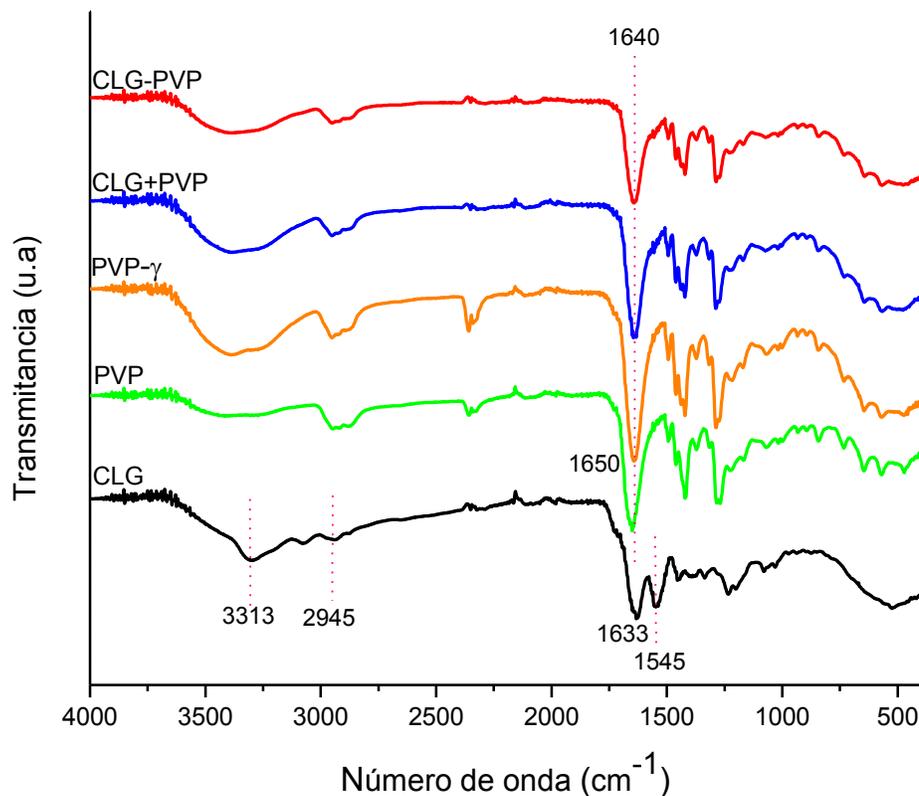


Figura 8. Espectros FTIR de las muestras liofilizadas con resolución de 4 cm<sup>-1</sup> a temperatura ambiente.

---

La irradiación gamma en la muestra de PVP (PVP- $\gamma$ ), probablemente favorece la polimerización y el entrecruzamiento del polímero, dado que se observa el incremento en la intensidad de las bandas de absorción de 3500 a 3200  $\text{cm}^{-1}$  que se atribuyen a la vibración de elongación del OH ( $\nu$ ) del polímero, al OH ( $\nu$ ) del agua y al NH que se encuentran en la misma ventana espectral. La banda de absorción de C=O aparece en 1650  $\text{cm}^{-1}$  para PVP y 10  $\text{cm}^{-1}$  más bajo para PVP- $\gamma$ . Esto se explica porque C=O interacciona por puentes de hidrógeno que se favorecen con la irradiación.

El espectro de la mezcla (CLG+PVP) y el copolímero CLG-PVP tienen espectros similares, presentan la banda de absorción de la amida primaria a 1640  $\text{cm}^{-1}$  que resulta de la vibración de tensión del grupo carbonilo peptídico (-C=O). La banda ancha entre 3600 y 3200  $\text{cm}^{-1}$  persiste, por lo que no se puede concluir que haya formación de puentes de hidrógeno ya que la banda parece ser una suma de las bandas de CLG y PVP. No obstante, se tiene que hacer una remarca: la banda atribuida en 1545  $\text{cm}^{-1}$  debida a la deformación en el plano de una amina no está presente en estas muestras pero si en CLG. Esto simplemente se debe a la composición, el espectro de la PVP domina el de CLG-PVP.

Se esperaría que el espectro de CLG+PVP se asemejara más al espectro de PVP (debido a que la PVP está en mayor concentración que la colágena) pero no es así. Los espectros de CLG+PVP y CLG-PVP son más parecidos a la PVP- $\gamma$ . Más aún, parece que también la mezcla de CLG con PVP propicia la formación de puentes de hidrógeno.

#### **VI.4 Resonancia Magnética Nuclear**

Siguiendo con la caracterización estructural, se usó la RMN de líquidos para tratar de elucidar las interacciones entre la colágena y la polivinilpirrolidona.

#### VI.4.1 Espectroscopía $^1\text{H}$ RMN en estado líquido.

El espectro  $^1\text{H}$  RMN de la PVP, figura 9, presenta las señales típicas del polímero, los picos a (3.65, 3.79 ppm) y b (1.59, 1.74 ppm) se asignaron, de acuerdo a la bibliografía, a la cadena principal de carbonos ( $-\text{CH}-$  y  $-\text{CH}_2-$ , respectivamente) mientras que los picos c (3.32, 3.41 ppm), d (2.03 ppm) y e (2.32, 2.45 ppm) se atribuyeron a los tres grupos de metileno en el anillo de la pirrolidona. En el espectro de PVP- $\gamma$ , las señales a que se identificaron en el espectro de la PVP prácticamente no se observan, esto podría atribuirse a la dosis de irradiación gamma recibida en la muestra propiciando la fragmentación de la PVP. Sin embargo, si éste fenómeno ocurre, deberían aparecer las señales correspondientes al grupo  $-\text{CH}_3$  en la región 0.6-1.3 ppm debidas al término de la cadena polimérica, lo cual no se observa. No obstante, con la irradiación se observa un incremento en la intensidad de las señales etiquetadas como c, lo que sugiere que no se lleva a cabo una polimerización sino todo lo contrario, nuevamente se sugiere de una disminución del peso molecular.

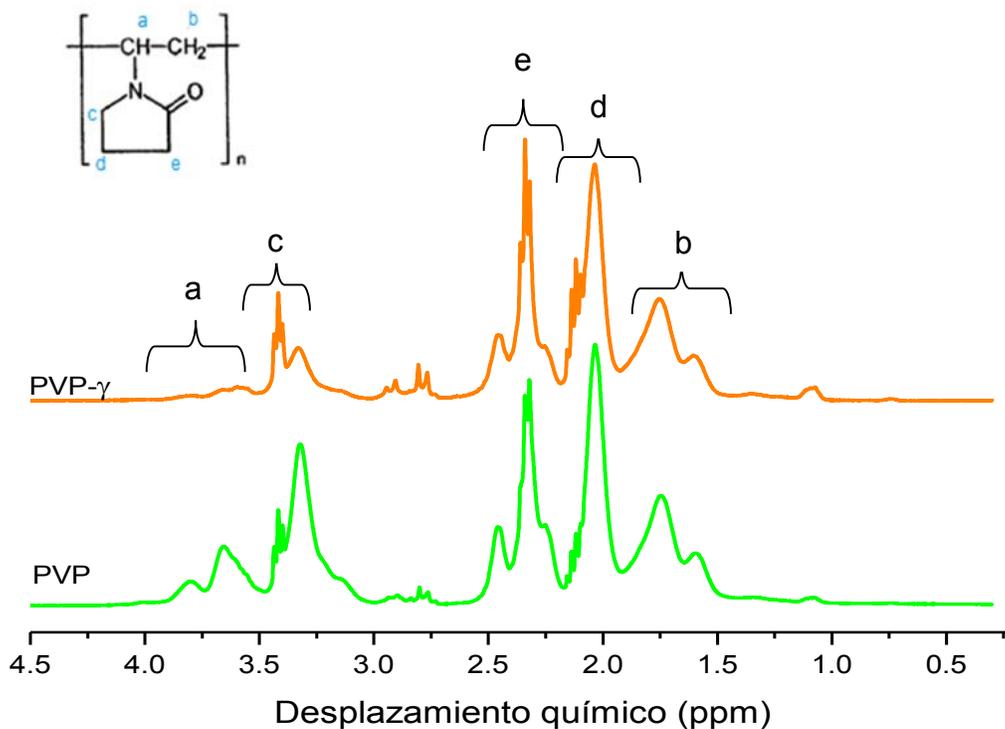


Figura 9. Espectro  $^1\text{H}$  RMN de PVP y PVP- $\gamma$ .

---

El espectro  $^1\text{H}$  RMN de colágena (CLG), figura 10, presenta un pico en 2.06 ppm que se atribuye a los hidrógenos del carbono  $\beta$  de la alanina, a campo más bajo se observan picos entre 2.7 y 2.95 ppm que corresponden a los hidrógenos de los carbonos menos apantallados, como son los hidrógenos del carbono  $\delta$  de la Pro, OHPro, figura 10 a. Los picos correspondientes a los grupos NH y OH no aparecen en el espectro debido a que estos hidrógenos se intercambian con el deuterio del solvente.

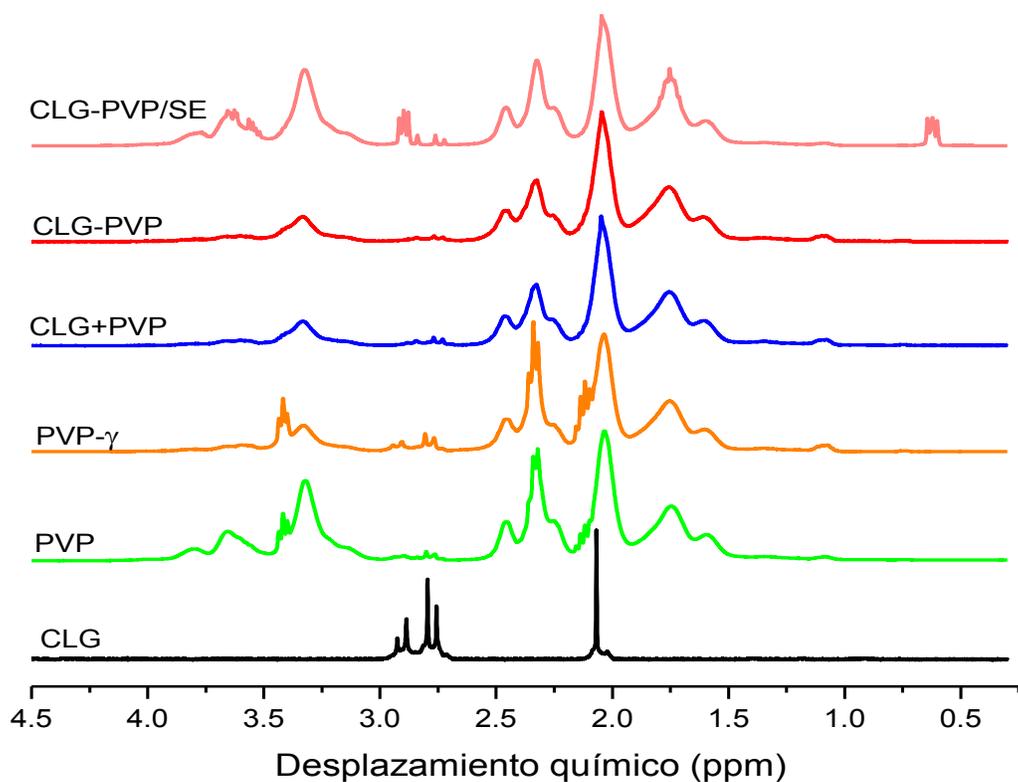


Figura 10. Espectros  $^1\text{H}$  RMN de CLG, PVP, PVP- $\gamma$ , CLG+PVP, CLG-PVP y CLG-PVP/SE.

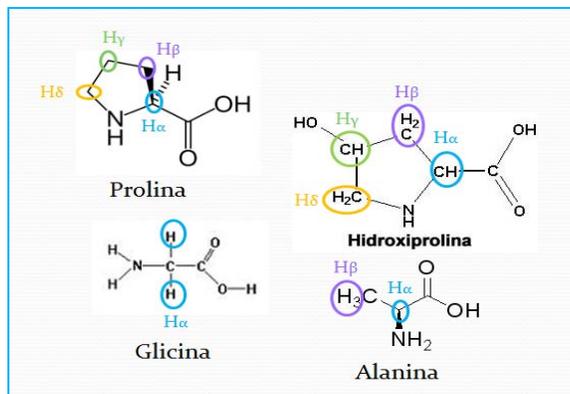


Figura 10 a. Hidrógenos identificados en los espectros  $^1\text{H}$  RMN.

El espectro de la mezcla de colágena con PVP (CLG+PVP) presenta las señales de la CLG y la PVP puros con excepción de las señales finas (3.4 ppm) de la PVP, esto puede deberse a la interacción que hay entre la proteína y el polímero. Específicamente, los hidrógenos del carbono c de la PVP interaccionan con la CLG provocando pérdida de movilidad de la molécula al aumentar el peso molecular de la mezcla.

La irradiación de la colágena con PVP (CLG-PVP) parece no tener efecto sobre el ambiente de los hidrógenos, el espectro no presenta diferencias significativas con respecto a la mezcla CLG+PVP. De hecho, estos dos espectros son muy similares al de la PVP, por tanto se decidió preparar una nueva muestra eliminando el excedente de PVP.

El espectro de CLG-PVP sin el excedente de PVP (CLG-PVP/SE) presenta dos señales que no se observaron en el espectro de CLG-PVP, el singulete en 2.9 ppm de la CLG paso a ser un triplete en el espectro de CLG-PVP/SE el cual se atribuye a los protones del carbono delta ( $\delta$ ) de la prolina e hidroxiprolina. También presenta otra señal en 0.6 ppm, atribuida al grupo  $-\text{CH}_3$  debidas al término de la cadena polimérica, como resultado de la fragmentación del copolímero. Este resultado sugiere que hay una interacción entre la prolina e hidroxiprolina de la colágena y los  $\text{CH}_2$  del anillo de la PVP.

La proporción de CLG y PVP en solución no permite elucidar con claridad las señales RMN de colágena, además de que en estado líquido las interacciones

---

dipolares se promedian. Así, se decidió hacer algunos experimentos RMN en estado sólido.

#### VI.4.2 Espectros $^{13}\text{C}$ CP/MAS RMN en estado sólido.

Con la finalidad de observar si la colágena y la PVP estaban compuestos de partes que difieren en su movilidad, en los espectros  $^{13}\text{C}$  CP MAS RMN de colágena, figura 11, se varió el pulso de contacto desde  $100\ \mu\text{s}$  hasta  $5\ \text{ms}$ , sin embargo, no se observan cambios significativos en la intensidad de señales, mostrando así, que la proteína tiene una movilidad uniforme, únicamente se ve afectada la señal del grupo carbonilo, el cual no tiene hidrógenos. Por lo tanto, sólo se observaron cambios en la transferencia de magnetización.

Los espectros  $^{13}\text{C}$  CP MAS RMN de colágena nativa, figura 11 y 12, presentan las señales asignadas a los aminoácidos más abundantes en la proteína (Pro, OHPro, Gli, Ala).

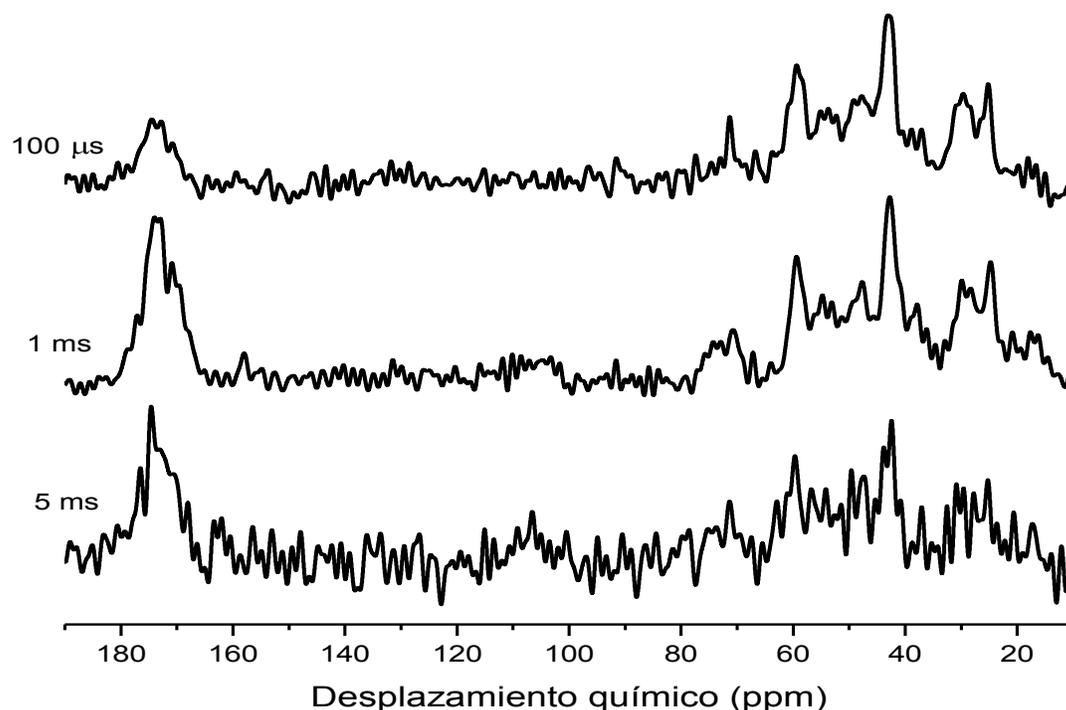


Figura 11. Espectros  $^{13}\text{C}$  CP MAS de RMN de colágena con pulsos de contacto de (1)  $5\ \text{ms}$ , (2)  $1\ \text{ms}$  y (3)  $100\ \mu\text{s}$ .

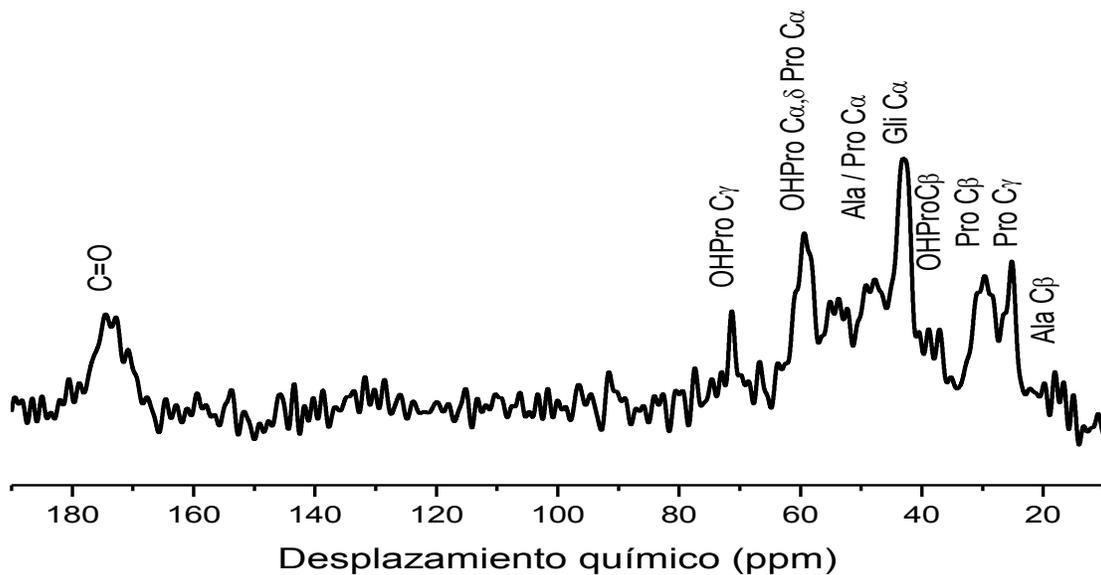


Figura 12. Espectros  $^{13}\text{C}$  CP MAS de RMN de Colágena nativa.

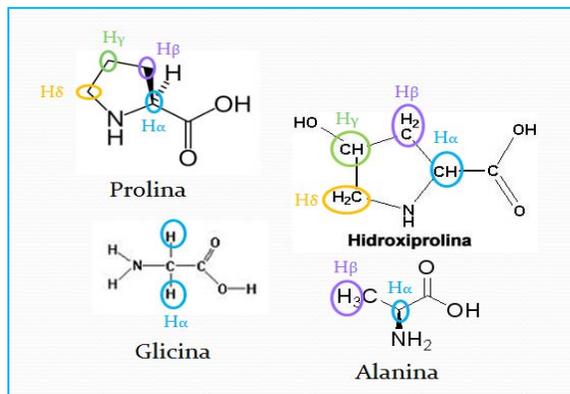


Figura 12a. Aminoácidos más abundantes en la colágena.

Los espectros de PVP y PVP- $\gamma$ , figura 13, CLG+PVP, figura 14, y CLG-PVP, figura 15, al variar el pulso de contacto, no presentan cambios notables ni en la intensidad ni en el ancho de los picos, únicamente en el carbonilo se afecta la intensidad. Esto sugiere que la cadena de carbonos para la colágena como para la PVP no tiene movilidad, es decir, es rígida.

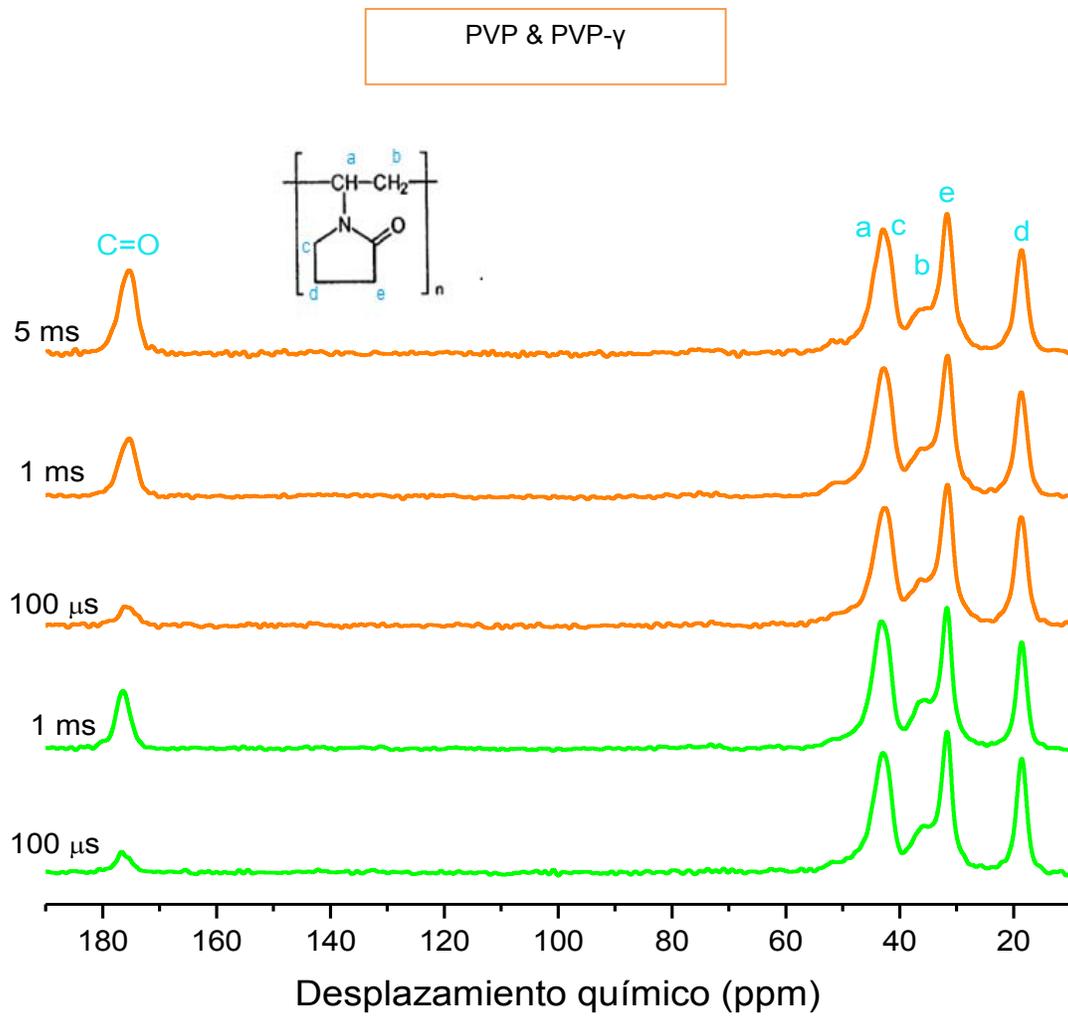


Figura 13. Espectros  $^{13}\text{C}$  CP MAS RMN de PVP (verde) y PVP- $\gamma$  (naranja) con diferentes pulsos de contacto.

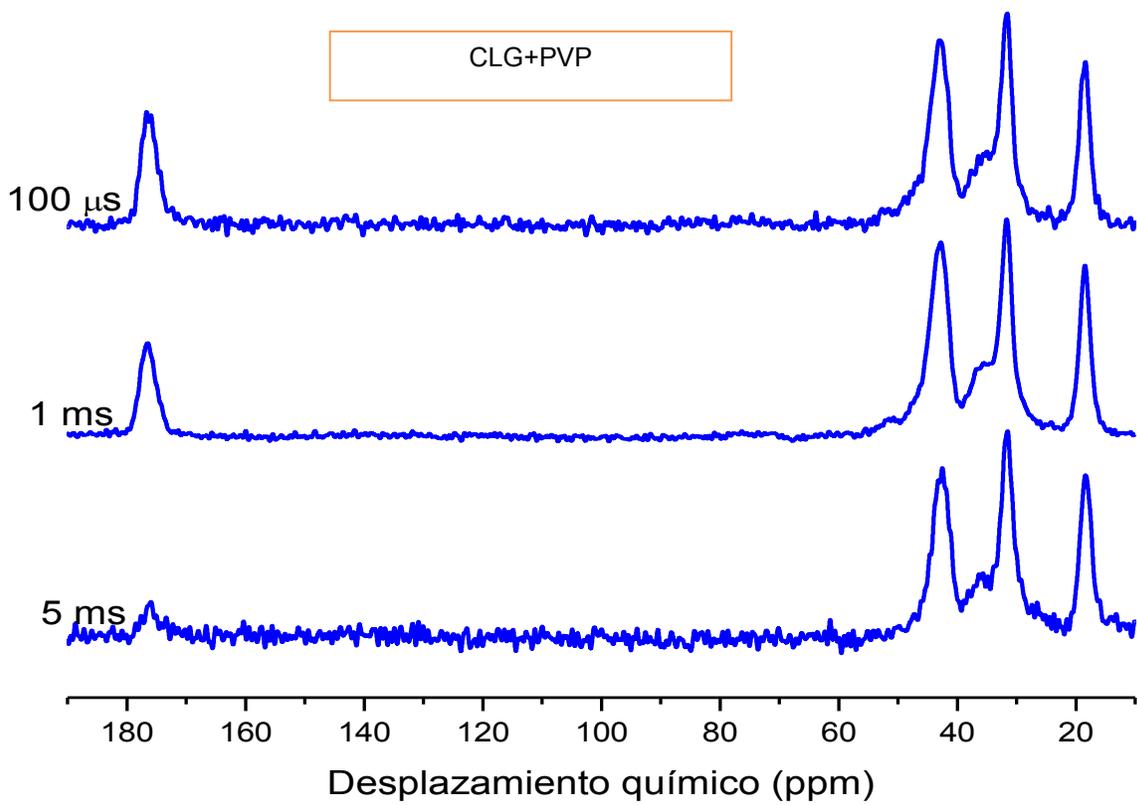


Figura 14. Espectros  $^{13}\text{C}$  CP MAS RMN de CLG+PVP con pulsos de contacto de 100  $\mu$ s, 1 ms y 5 ms.

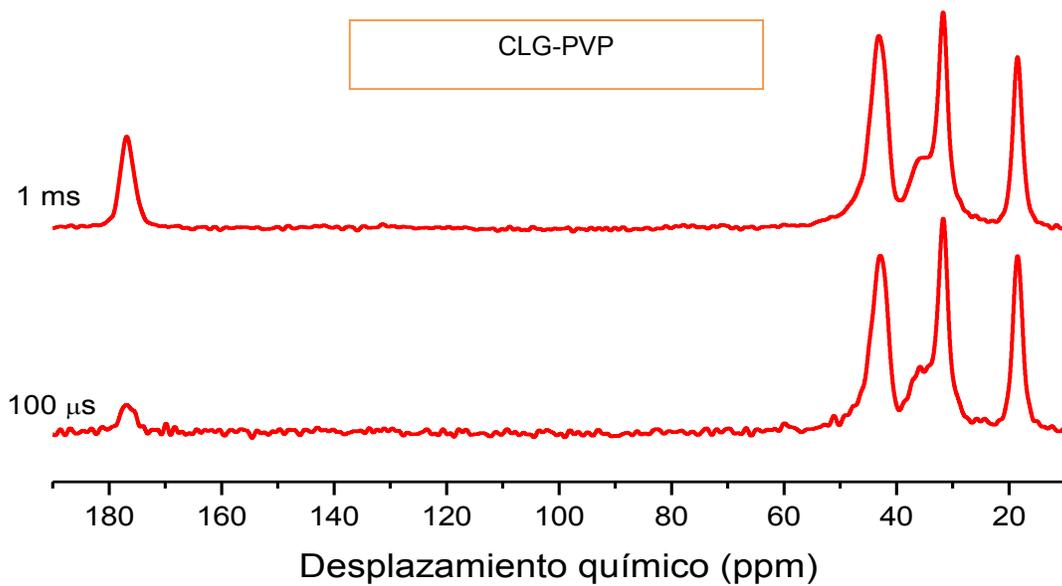


Figura 15. Espectros  $^{13}\text{C}$  CP MAS RMN de CLG-PVP con pulsos de contacto de 1 ms y 100  $\mu$ s.

El espectro  $^{13}\text{C}$  CP MAS RMN en estado sólido de CLG-PVP, figura 16, presenta las señales tanto de CLG como de PVP aunque es necesario remarcar que algunas de ellas podrían traslaparse, por ejemplo, en la ventana espectral de 45-50 ppm el carbono etiquetado como  $\alpha$  de la prolina y alanina con el carbono etiquetado como a de la PVP y de 35-40 ppm  $\text{C}_\beta$  de la hidroxiprolina con el carbono etiquetado como b en la figura 13 de la PVP.

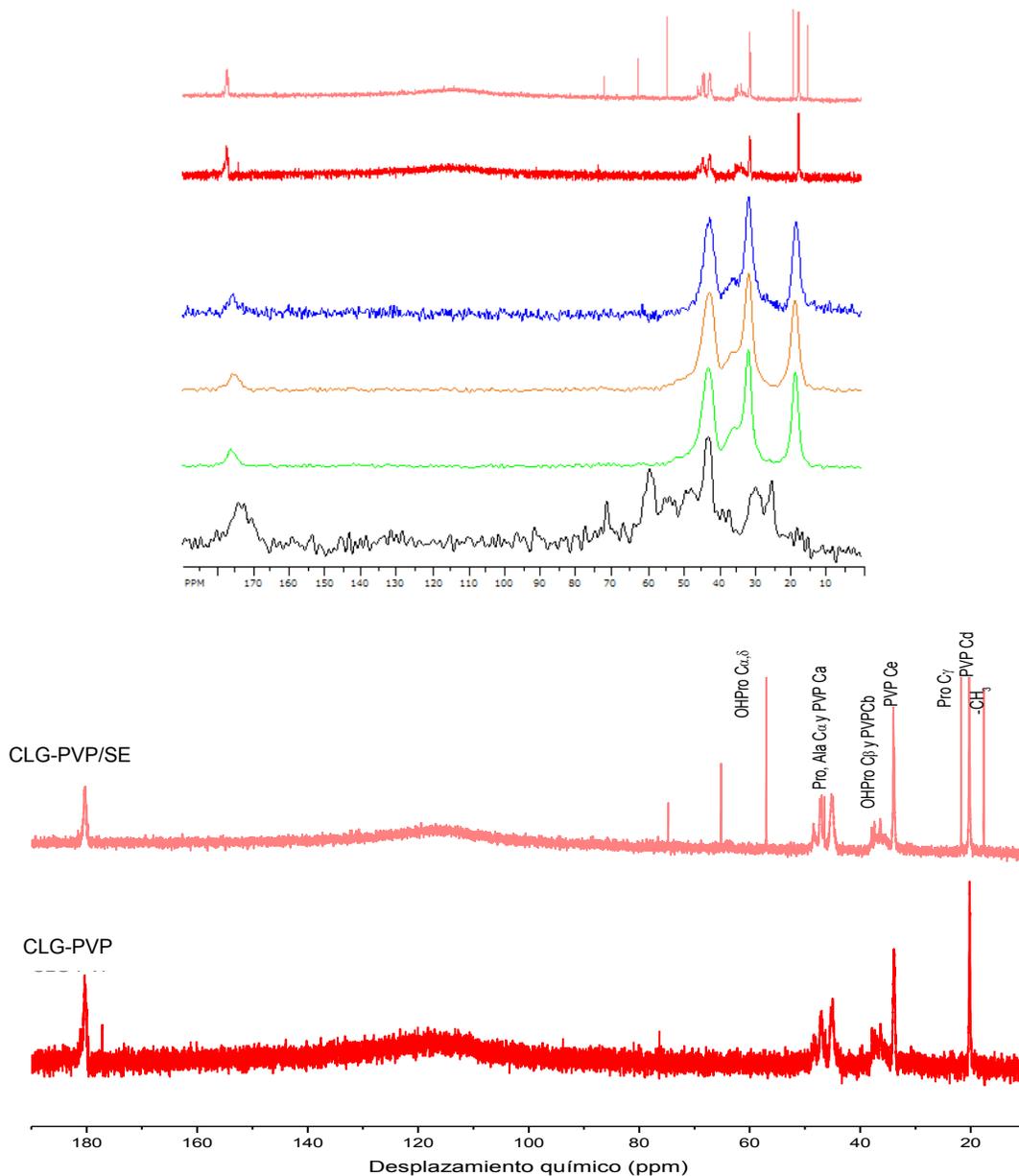


Figura 16. Espectros  $^{13}\text{C}$  CP MAS RMN de CLG-PVP y CLG-PVP/SE.

---

El espectro de CLG-PVP/SE presenta la señal de grupos metilo en 17.6 (como el espectro  $^1\text{H}$  de líquidos) debidas al término de la cadena polimérica y carbonos unidos a grupos polares como el nitrógeno (C-N) en 56.8. Los resultados RMN MAS sugieren una interacción dipolar de CLG con PVP estabilizando al copolímero cuando se fragmenta por la radiación.

Cabe mencionar que estequiométricamente, el 55,8 % del copolímero CLG-PVP se polimerizó con la colágena; por lo que la fracción libre podría tener un papel importante en la protección del copolímero al ser irradiado. Este experimento se realizó en un centrifugador en el laboratorio de tejido conjuntivo del INR.

---

## VI.5 Microscopía electrónica SEM y AFM.

### VI.5.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Las morfologías del copolímero liofilizado y sus precursores se caracterizaron utilizando SEM. Las micrografías en la figura 18, evidencian la morfología fibrilar típica de la colágena, las fibras son flexibles, tienen una resistencia tensora notable y no son totalmente lisas, esta característica se deriva de su estado nativo; presentan un bandeo (rugosidad) que se atribuyen a las fibrillas colágenas (aparecen como subunidades filamentosas finas). En la imagen A se observa la formación de haces de fibras que poseen la morfología engarzado característica en tendones y ligamentos no maduros dichas fibras tienen diámetros diferentes como 7.8  $\mu\text{m}$ , 10.8  $\mu\text{m}$ , 23  $\mu\text{m}$  etc. La tensión entre las fibras de colágena formaron huecos que están alineados en una misma dirección, imagen B, sin embargo difieren en su tamaño, por ejemplo, hay huecos que miden 72  $\mu\text{m}$ , 87.6  $\mu\text{m}$ , 92.7  $\mu\text{m}$  de ancho y alto de 109.3  $\mu\text{m}$ , 143  $\mu\text{m}$ , 168  $\mu\text{m}$ , 192.7  $\mu\text{m}$  etc.

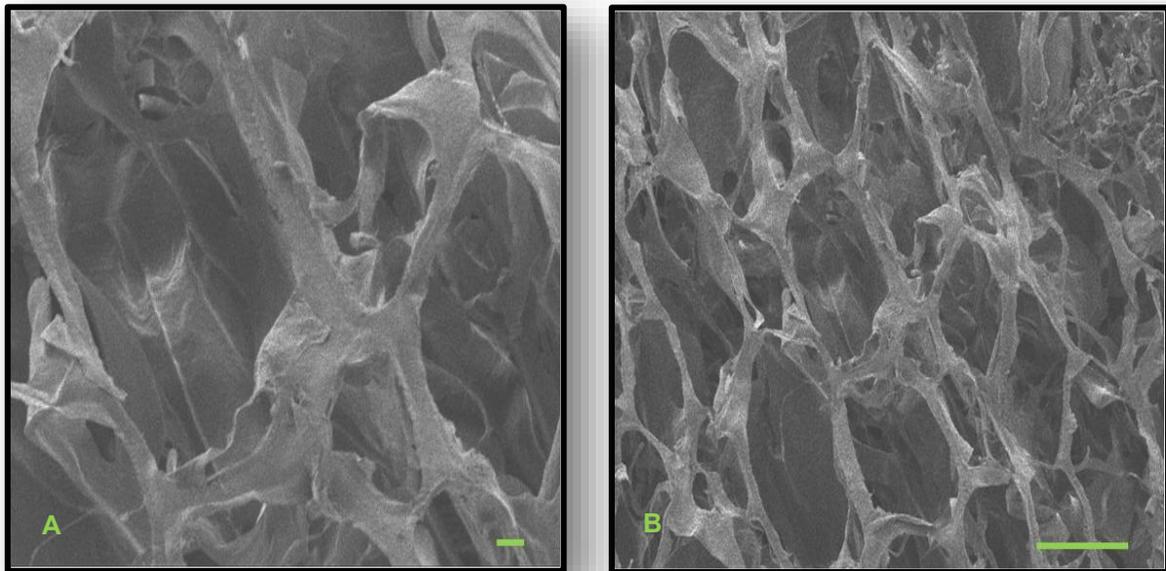


Figura 18. Micrografías de colágena, la barra de escala es equivalente a (A) 10  $\mu\text{m}$  y (B) 100  $\mu\text{m}$  con aumentos de 500x y 200x respectivamente.

La longitud exacta de las fibras de colágena por SEM, figura 19 (C), no fue posible cuantificarla, debido a que la preparación fibrilar in vitro probablemente no es un reflejo de la longitud total de una fibrilla in vivo. Al analizar la muestra no

---

fue posible identificar alguna fibra sin reticular. La interrupción y dispersión de la estructura fibrilar de los tejidos conduce inevitablemente al rompimiento de las fibrillas, por lo que la longitud de las fibras no puede ser representativa de la longitud fibrilar total. El perfil de reticulación varía con tipo de tejido, por ejemplo la piel, el hueso y el tendón, todos tienen diferentes perfiles, pero también depende de la presión relativa de estos tejidos, la velocidad de cambio en su volumen y de la edad del tejido.

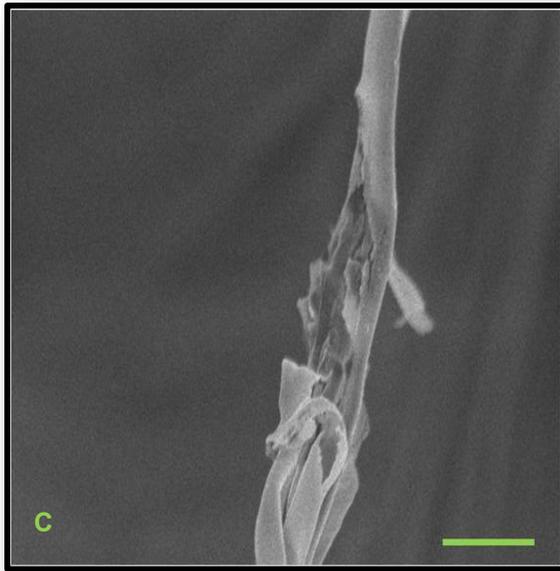


Figura 19. Imagen SEM de una fibra de colágena nativa, la barra de escala es equivalente a 1 $\mu$ m. Aumento de 20 000x.

La PVP formó una película con pequeños depósitos irregulares de partículas amorfas de 0,1  $\mu$ m y grandes agregados de más de 0.5  $\mu$ m.

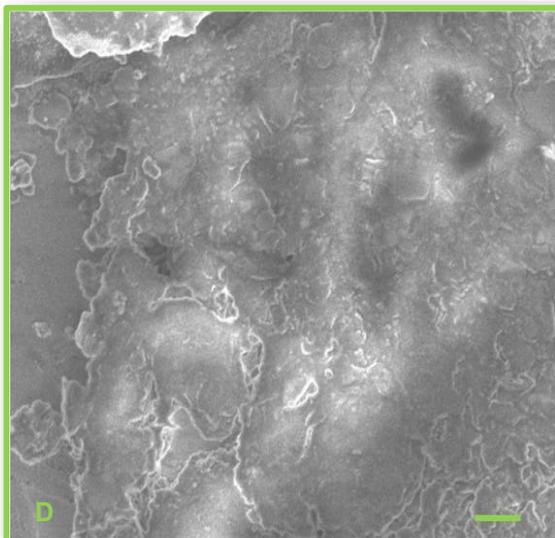


Figura 20. Imagen SEM de PVP, la barra de escala es equivalente a 1 $\mu$ m. Aumento 10 000x.

---

La mezcla de colágena con PVP (CLG+PVP), figura 21 (E), mostraron una morfología híbrida, es decir, que presenta las fibras y espacios interfibrilares de la colágena cubiertas con una película homogénea de PVP, la superficie compacta está referida a la PVP en exceso. Este resultado fue especialmente evidente cuando las imágenes se obtuvieron a mayor aumento, figura 21 (H).

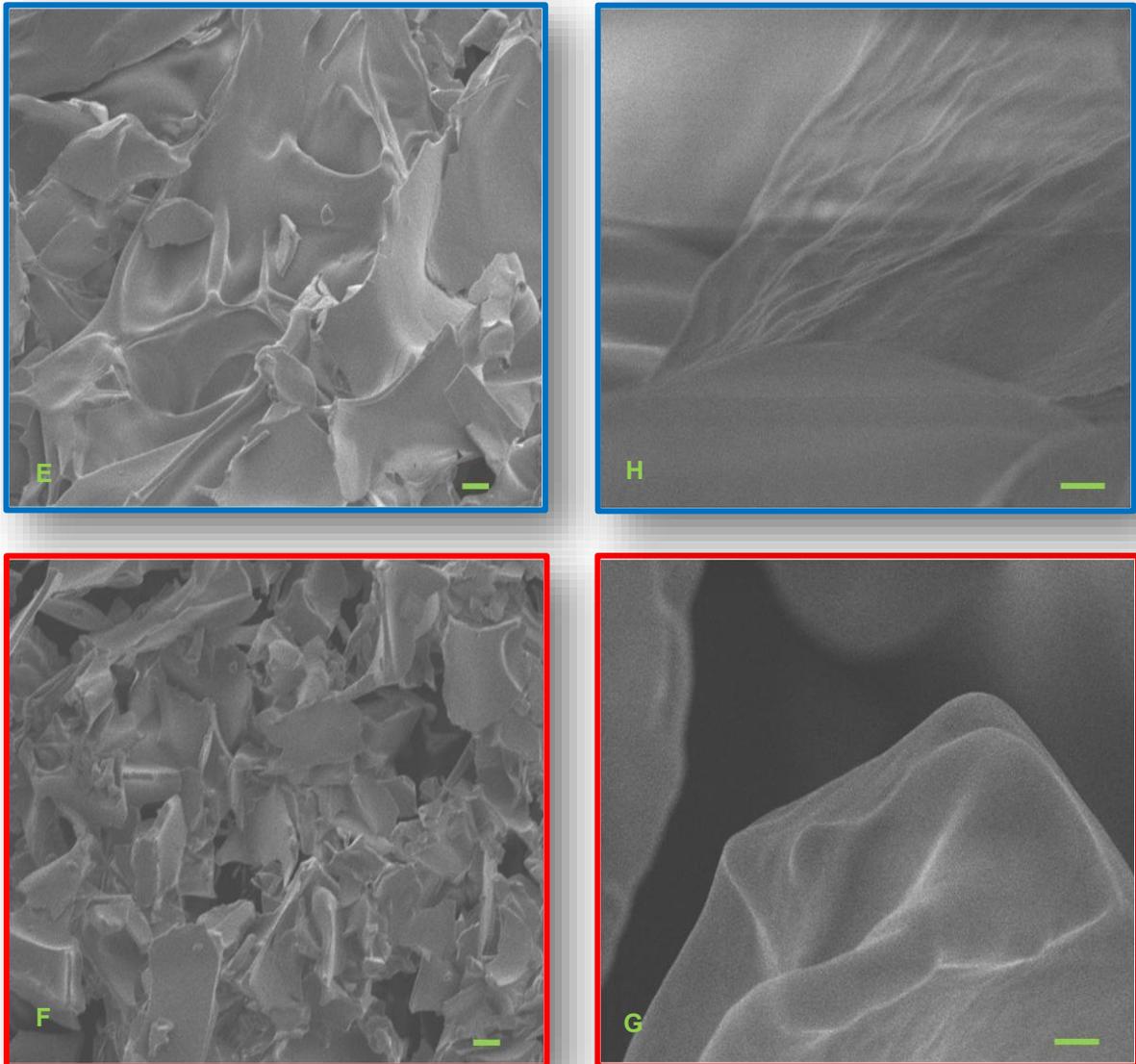


Figura 21. Micrografías de la mezcla CLG+PVP y el copolímero CLG-PVP, la barra de escala es equivalente a 10  $\mu\text{m}$  (E y G) y 1  $\mu\text{m}$  (F y H). Aumentos de (E y G) 500x y (F y H) 10 000x

---

Sin embargo, a pesar de la similitud en la apariencia morfológica, el copolímero CLG-PVP presenta una mezcla fragmentada, observándose el rompimiento de las fibras de colágena causado por la irradiación gamma, figura 21 (F y G).

Al retirar el exceso de PVP del copolímero, se observa mejor la fragmentación de las fibras de colágena en la muestra, figura 22 (I), la cual no es uniforme. Así, se sugiere que la humedad de la muestra y el excedente PVP juega un papel importante en la formación del biomaterial, ya que protege al copolímero estabilizando el entrecruzamiento favorecido por la radiación gamma, sin embargo, también resta movilidad a la colágena; mientras que la cantidad de colágena en la matriz de PVP también ha tenido un efecto importante en la estructura de las fibras de colágena formadas.

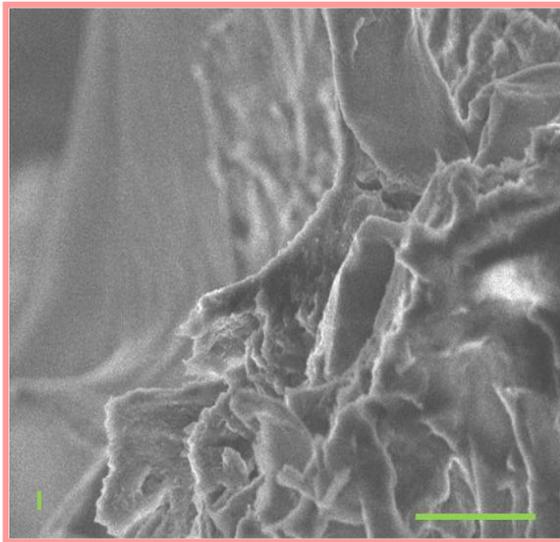


Figura 22. Imagen SEM de CLG-PVP/SE, la barra de escala es equivalente a 1  $\mu\text{m}$  con aumento de 25 000x.

---

### VI.5.2 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

Siguiendo con el análisis morfológico del copolímero, se utilizó la AFM para identificar el patrón fibrilar de la colágena, la distribución de la PVP en el copolímero y por consiguiente algunas propiedades del biomaterial. La superficie de la PVP sin irradiar, figura 23, presenta pequeñas partículas que forman una película homogénea y plana, sin embargo, al irradiar la PVP (PVP- $\gamma$ ) presenta una superficie con pequeños depósitos irregulares de partículas que se compactan, formando en el centro de éste, una especie de láminas de superficie plana como si esos depósitos se reordenaran y además se fragmentaran. Las micrografías de colágena muestran las formas típicas onduladas de espesor variable y longitud indeterminada, las fibrillas de colágena aparecen como haces de subunidades filamentosas finas, tienen un diámetro relativamente uniforme de 68 nm.

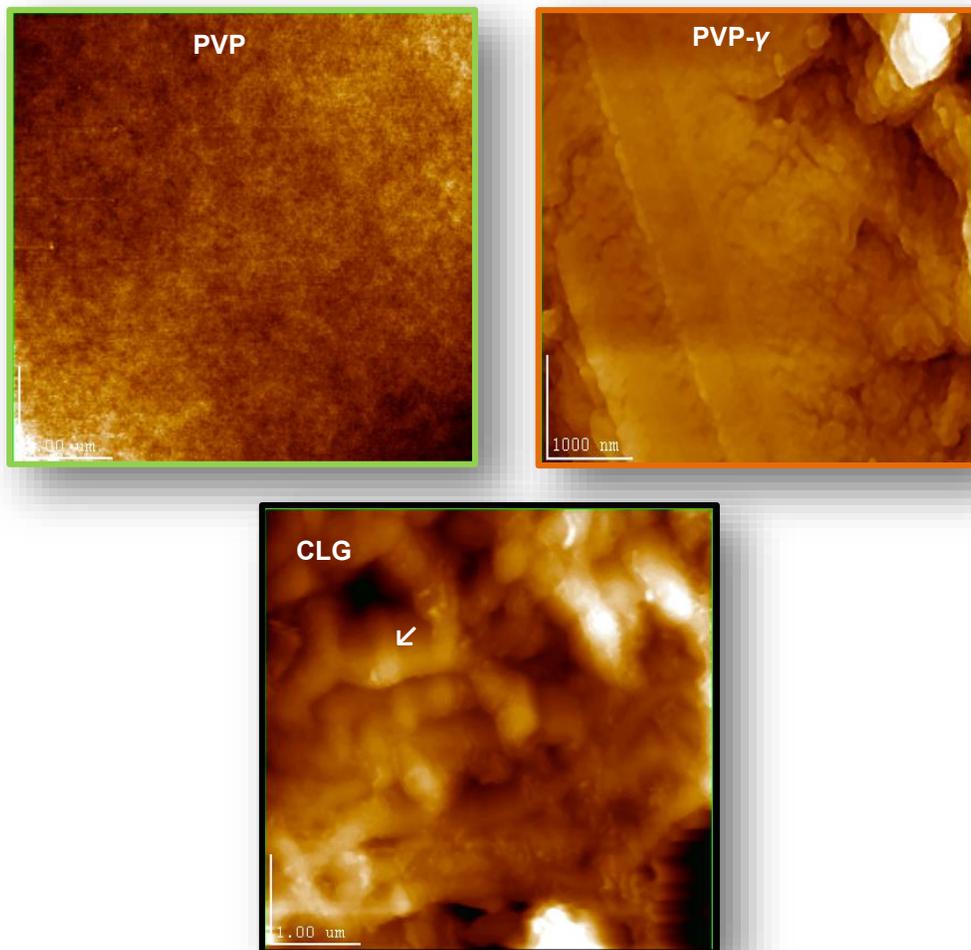


Figura 23. Precursores del copolímero CLG-PVP. La flecha en CLG señala una fibrilla colágena.

---

La banda que se observa en la figura 23, señalada con una flecha, es un reflejo de la estructura en subunidades de la fibrilla y, específicamente, del tamaño y la forma de la molécula de la colágena y de la disposición de las moléculas que forman la fibrilla. La molécula de colágeno (que antes se llamaba tropocolágeno) mide alrededor de 300 nm de longitud y 1.5 nm de diámetro y tiene una cabeza y una cola. Al formar la fibrilla las moléculas de colágeno se alinean cabeza con cola en hileras que se superponen con brechas entre las moléculas de cada hilera y un desfase de un cuarto de molécula entre las moléculas contiguas. Estas brechas pueden verse también en la figura 24 (3D).

La micrografía de CLG+PVP muestra las fibras de colágena cubiertas por la PVP, sin embargo, parece tener un efecto diferente a lo observado en SEM. La mezcla CLG+PVP presenta no sólo las fibras de colágena dispersas en una superficie lisa referida a la PVP, además se observan pedazos pequeños de una fibra como parte de una fragmentación. Esto podría deberse al tratamiento previo que se le dio a la muestra antes de ser cuantificada o durante la liofilización.

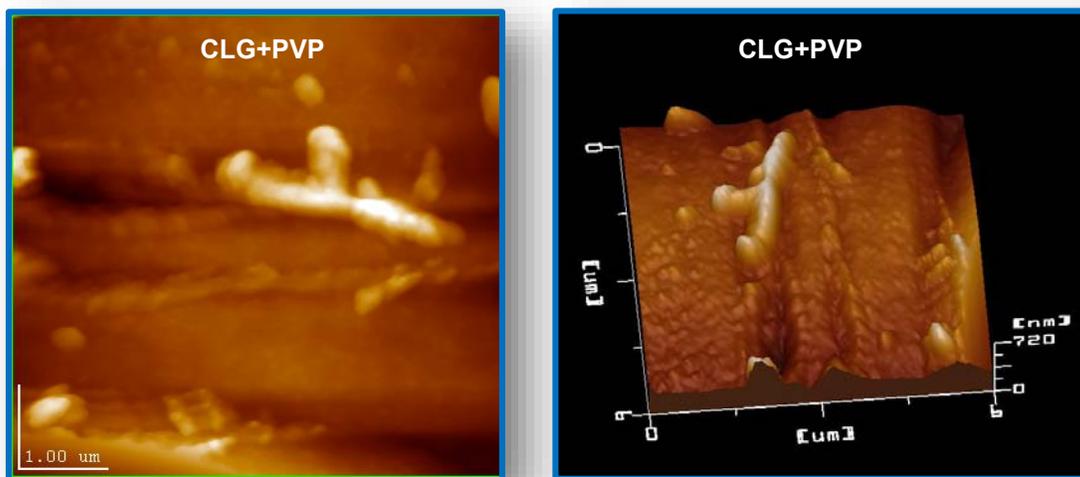


Figura 24. Imagen AFM de la mezcla liofilizada de CLG+PVP (topografía y 3D).

Al hacer un mayor acercamiento a la superficie de la muestra de CLG-PVP, figura 25, se observan las fibras de colágena más ordenadas pero con una superficie más rugosa que la de la colágena. Esto podría atribuirse a que que la radiación

---

gamma indujo al entrecruzamiento entre los dos polimeros y la molécula de la triple hélice de la colágena se vuelve rígida por el exceso de PVP, cambiando la estructura en el copolímero, figura 25. Sin embargo, la estructura de la triple hélice de la colágena no es fácil de detectar debido a su tamaño pequeño comparado a la alta rugosidad de las muestras CLG y CLG-PVP.

Los perfiles de línea calculados entre los puntos A-B para CLG-PVP y C-D para CLG-PVP/SE mostraron las variaciones en la superficie del material que se observaron en SEM. El perfil de línea entre los puntos A y B presenta una superficie menos rugosa, es decir, las fibras de colágena están totalmente cubiertas por la PVP, en comparación con el copolímero CLG-PVP/SE, el perfil de línea entre los puntos C y D presenta una superficie más rugosa debido a las fibras colágenas aún cuando en la micrografía se observan sólo pequeños fragmentos de colágena dispersos en una superficie semiplana de PVP, lo que indica que la reticulación entre la colágena y la PVP se acompañó de un cambio en la textura inducida por la radiación.

Se concluye que, los diversos tamaños en los diámetros de las fibras de colágena y la reticulación inducida por radiación gamma son responsables de la modificación de la superficie. La reticulación inducida por la radiación se produjo acompañada por la segmentación de las fibras de colágena, apoyada por SEM y los resultados de RMN y, en consecuencia, las fibras se reorganizan para dar lugar a una modificación de la textura del biomaterial.

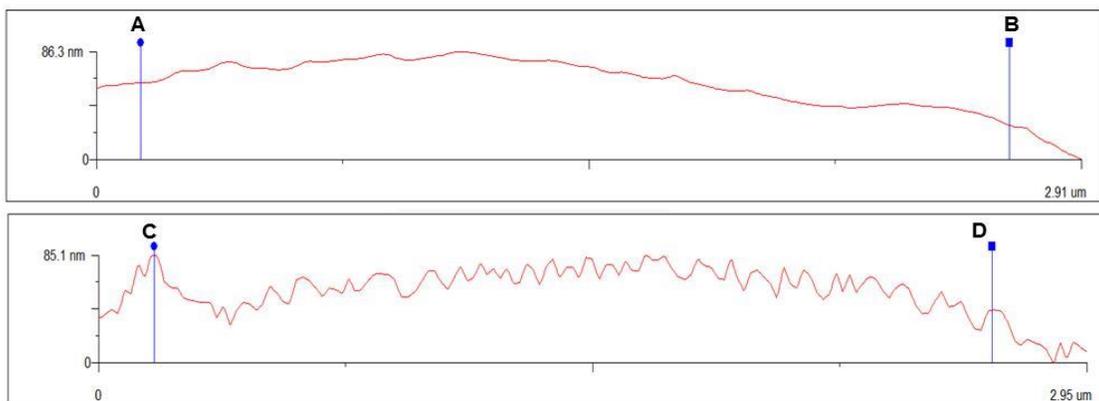
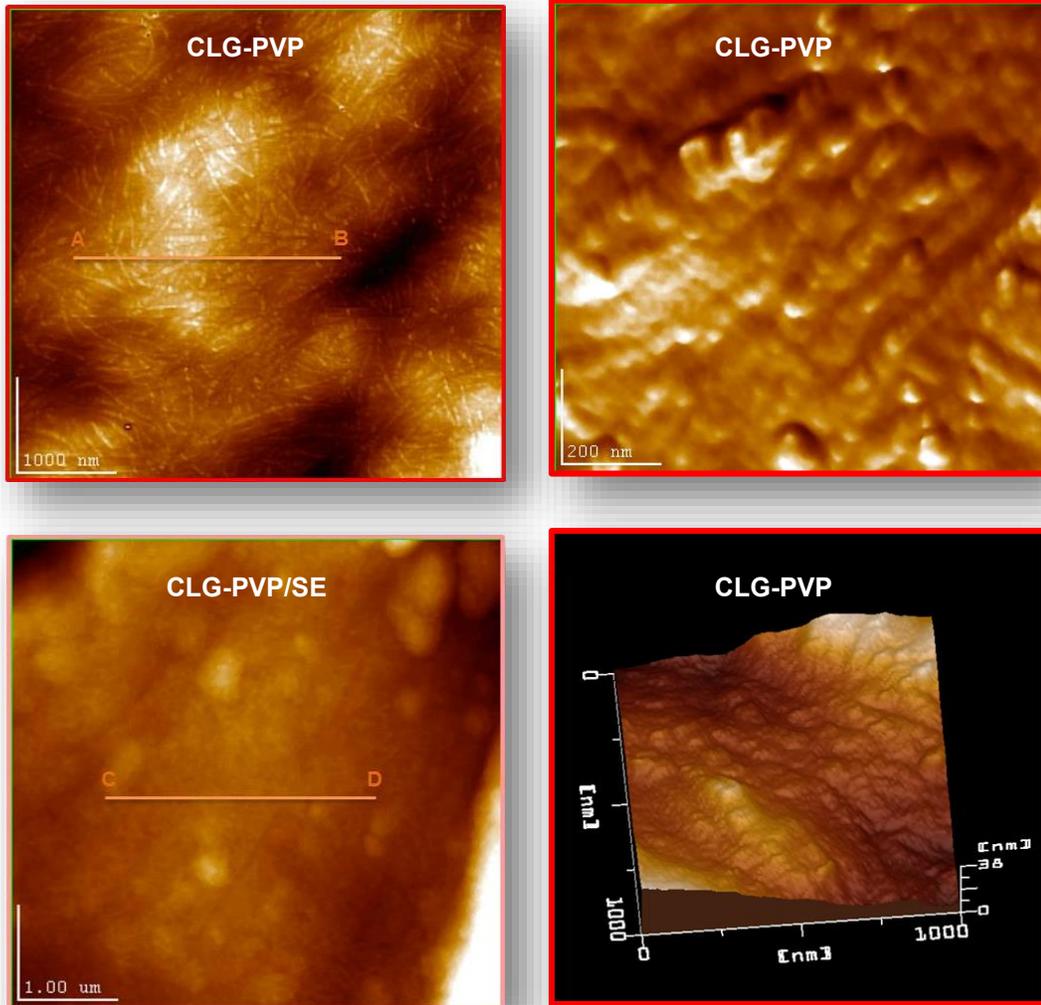


Figura 25. Imágenes AFM del colpolímero CLG-PVP, CLG-PVP (3D) y CLG-PVP/SE. Las barras de escala en las esquinas inferior izquierda indican el tamaño en micras, 1.0 μm y 0.2 μm, respectivamente. Los gráficos muestran los perfiles de líneas entre los puntos AB y CD.

---

## VI.6 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Analizar la estabilidad térmica del copolímero CLG-PVP es de gran importancia, debido a que las transiciones térmicas de los materiales poliméricos están relacionadas con los cambios en su estructura y por tanto con sus propiedades fisicoquímicas. Así, se llevaron a cabo análisis calorimétricos en donde se caracterizaron las muestras en estado sólido (liofilizadas) y líquido (en solución de citratos). Las figuras 26 y 27 muestran el comportamiento térmico (DSC) de las muestras.

Los termogramas de las muestras liofilizadas de PVP y PVP- $\gamma$  presentan las temperaturas de transición a 75 y 77.5 °C, respectivamente, figura 26 (a y b), correspondientes al inicio de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ). Ésta transición se manifiesta en los polímeros amorfos, es decir polímeros cuyas cadenas no están dispuestas según un ordenamiento cristalino, sino que están esparcidas en cualquier ordenamiento. Las variaciones de entalpías ( $\Delta H$ ) hacen referencia a la transferencia de energía a presión constante, en forma de calor, en las muestras y se puede relacionar con la estructura (presencia de enlaces fuertes o débiles). La  $\Delta H$  de la PVP- $\gamma$  disminuye con respecto a la PVP de 162.1 a 126.9 J/g respectivamente, tabla 4. Estos valores se atribuyeron a la absorción de agua en el material. La fragmentación de las cadenas poliméricas de PVP debida a la radiación gamma provocó tanto la liberación del agua ocluida entre las cadenas poliméricas de PVP, como un cambio en la estructura de la muestra. Los termogramas de la figura 26 (muestras liofilizadas) presentan en un evento endotérmico la absorción de energía para aumentar su temperatura y tener mayor movilidad en sus cadenas poliméricas.

El inicio de la temperatura de transición de la colágena liofilizada fue de 68.1 °C, figura 26 (c), la cual corresponde a un cambio estructural, sugiere que los enlaces de hidrógeno intermoleculares son más fuertes en estado sólido, proporcionando mayor resistencia a la temperatura que cuando está en estado líquido.

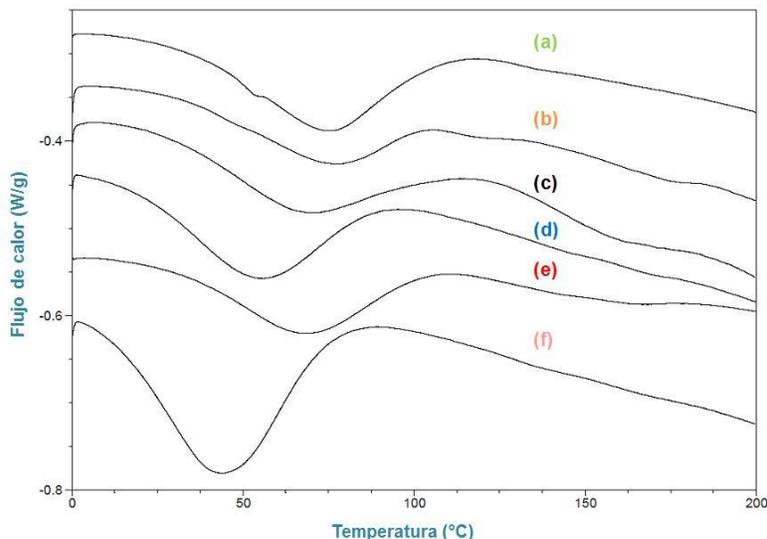


Figura 26. Termogramas DSC de la muestras en estado sólido (liofilizadas). (a) PVP, (b) PVP- $\gamma$ , (c) CLG, (d) CLG+PVP, (e) CLG-PVP y (f) CLG-PVP/SE.

El inicio de la transición térmica de la mezcla de CLG+PVP fue a 54.19 °C, figura 26 (d). Este valor es menor a 75 y 68.1 °C que son las temperaturas para los componentes puros de PVP y CLG, respectivamente. Este resultado puede interpretarse como la disminución de las interacciones del agua y la mezcla CLG+PVP, debido a que los grupos de CLG y PVP que interaccionaron con agua ahora están interaccionando entre sí.

El copolímero CLG-PVP presenta una Tg a 67.31 °C, figura 26 (e), la cual difirió notablemente de la temperatura de transición de CLG+PVP. Esto puede explicarse por la oclusión del agua en la muestra entre las cadenas de CLG y PVP que se han entrecruzado.

La muestra de CLG-PVP/SE presentó una Tg menor (44.14 °C) en comparación con el copolímero CLG-PVP, también incrementó el valor del  $\Delta H$  a 402.1 J/g, figura 26, (f). Este cambio estructural se atribuyó a la Tg acompañado de la pérdida de agua, debido a que la interacción del agua con el copolímero ha disminuido al retirarse el excedente de PVP, que probablemente recubría al

---

copolímero. Este nuevo material tuvo una resistencia al calor más bajo que la colágena o la PVP.

Comportamiento térmico de las muestras en solución.

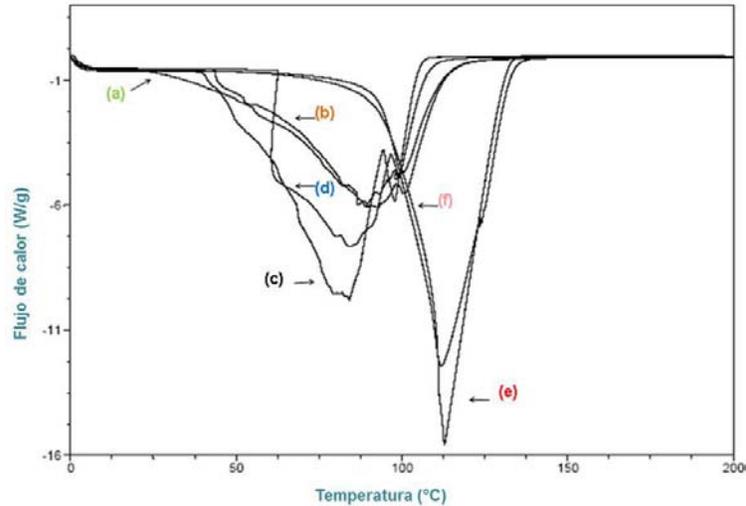


Figura 27. Termogramas DSC de la muestras en estado líquido. (a) PVP, (b) PVP- $\gamma$ , (c) CLG, (d) CLG+PVP, (e) CLG-PVP y (f) CLG-PVP/SE.

Los termogramas de las muestras en solución de PVP y PVP- $\gamma$  pesentan un comportamiento similar a las muestras liofilizadas en la variación de entalpía, figura 27 (a y b). El aumento de la Tg de 86.7 a 92.5 °C para la PVP y PVP- $\gamma$ , respectivamente, confirma los resultados de la caracterización estructural (RMN), la PVP se fragmenta como consecuencia de la radiación gamma. Los polímeros sin ordenamiento alguno son duros y quebradizos cuando se calientan por debajo de su temperatura de transición vitrea y blandos y flexibles por arriba de ella. La flexibilidad o rigidez de la PVP a una temperatura dada está determinada por lo que llamamos la movilidad de la cadena, es decir, cuan eficientemente las cadenas del polímero se deslizarán entre sí. La temperatura exacta a la cual las cadenas poliméricas experimentan este cambio en su movilidad, es cuando alcanzan su temperatura de transición vitrea, pero también depende de la estructura del polímero. Un cambio pequeño en la estructura, puede significar un gran cambio en la Tg. Por ejemplo, la radiación gamma que recibió la PVP en solución le proporcionó calor a la muestra incrementando su temperatura,

---

alcanzando así el inicio de su temperatura de transición vítrea. Esto también podría explicar el cambio en la textura observado por AFM.

El copolímero CLG-PVP que se formó a partir de la colágena en su estado "nativo", empieza a modificar su estructura secundaria a una temperatura ligeramente por encima de los 36.5 °C (temperatura del cuerpo humano), propiciando su desnaturalización cuando está en solución. La colágena en solución (5 mM de ácido acético), presenta el inicio de su temperatura de transición a 39.9 °C en un proceso endotérmico, lo que indica el inicio de su desnaturalización, figura 27, (c).

Esto se relacionó a un cambio conformacional en la estructura de la triple hélice, donde se produjo principalmente la desestabilización de la colágena debido a la interrupción de los enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares. Dicho de otra manera, el agua intermolecular (estructural) contribuye mayoritariamente a mantener la integridad de la triple hélice. Ésta agua crea fuertes interacciones entre ella y las cadenas alfa las cuales sólo se pierden cuando la molécula alcanza su temperatura de desnaturalización.

La muestra de CLG+PVP en solución también mostró una temperatura de transición menor en comparación con la PVP, a 84.2 °C, figura 27 (d). Este cambio puede atribuirse a los posibles enlaces intermoleculares formados entre la colágena y la PVP en solución y a los enlaces formados por el agua en la muestra.

El copolímero de CLG-PVP presenta la Tg a 111.9 °C, figura 27 (e), la cual difirió ligeramente de CLG-PVP/SE. Siendo CLG-PVP/SE la que presenta el valor de  $\Delta H$  mas alto. Esta diferencia en el comportamiento térmico se atribuye de la misma manera que a la muestra liofilizada, al excedente de PVP. Lo que sugiere que el excedente de PVP y el agua intermolecular proporcionan estabilidad a la molécula del copolímero CLG-PVP.

En contraste, la muestra de CLG-PVP/SE en solución, figura 27 (f), tuvo una resistencia al calor mayor que la muestra liofilizada, con una temperatura de

transición tan alta como 112.8 °C, esto puede atribuirse a el agua ocluida entre la cadenas del copolímero, la cual forma enlaces más fuertes estabilizando el entrecruzamiento. Esto podría explicar la resistensia a los cambios termicos y por lo tanto se necesita más energía para modificar su estructura. La conformación estructural del copolímero CLG-PVP/SE es más resistente al calor en comparación con la colágena cuando están en solución.

Muestra	Muestras liofilizadas		Muestras en solución	
	T (°C)	$\Delta H$ (J/g)	T (°C)	$\Delta H$ (J/g)
PVP	75	162.1	86.7	1295
PVP- $\gamma$	77.5	126.9	92.5	1243
CLG	68.1	181.8	84.2	1723
CLG+PVP	54.2	242	84.2	1350
CLG-PVP	67.3	198.9	111.9	1489
CLG-PVP/SE	44.1	402.1	112.8	1614

Tabla 4. Parámetros térmicos de las muestras liofilizadas y en solución.

---

## VII. CONCLUSIONES.

- La irradiación gamma favorece el entrecruzamiento de la colágena y la polivinilpirrolidona, manteniendo las propiedades tanto de la colágena como de la PVP. La textura del material también se modifica como consecuencia de la irradiación gamma, las superficies tienden a ser más rugosas.
- El copolímero CLG-PVP contiene un exceso del 42% de PVP.
- Existe una interacción entre la prolina e hidroxiprolina de la colágena y los CH<sub>2</sub> del anillo de la PVP. La radiación gamma sobre la mezcla de colágena con PVP induce una fragmentación de las cadenas PVP. Las cadenas de carbono PVP y colágena no poseen partes móviles, tienden a ser rígidas.
- Los resultados de calorimetría mostraron que el copolímero en solución tiene mayor resistencia a los cambios térmicos que en estado sólido, mostrando cambios en su estructura hasta los 111 °C. Además de que el agua ocluida entre las cadenas del copolímero, en compañía del excedente de PVP estabilizan el entrecruzamiento. El 55.8% de la PVP total en la muestra de CLG-PVP se polimeriza con la colágena tipo I, la PVP libre tiene un papel importante en la protección del copolímero ante la radiación y la temperatura.

---

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- ◆ Atkins P, De Paula J. (2006). *Química Física*, 8ª edición. Editorial Panamericana. 432-433.
- ◆ Bailey A, Rhodes D, Cater C. (1964). Irradiation-Induced crosslinking of collagen. *Radiation Research*. 22, 606-662.
- ◆ Bailey A. (1968). Effects of ionizing radiation on connective tissue components. *International Review of Connective Tissue Research*. 4, 233- 281.
- ◆ Devlin T. (2004) *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*, 5ª edición. Barcelona. Reverte. 121-122.
- ◆ Black J. (1999). *Biological performance of material: fundamentals of biocompatibility*, 3ª edición. New York: M. Dekker. 3-12.
- ◆ Blum R, Ruggiero F, Van der Rest M. (2005). The collagen superfamily. *Topics in Current Chemistry*. 247, 35–84.
- ◆ Brinckmann J. (2005). *Collagens at a Glance*. *Topics in Current Chemistry*. 247,1-6.
- ◆ Cameron G, Alberts I, Laing J, Wess T. (2002). Structure of type I and type III heterotypic collagen fibrils: An X-ray diffraction study. *Journal of Structural Biology*. 137, 15-22.
- ◆ Cheung D, Perelman N, Tong D, Nimni M. (1990). The effect of  $\gamma$ -irradiation on collagen molecules, isolated  $\alpha$ -chains, and crosslinked native fibers. *Journal of Biomedical Materials Research*. 24, 581-589.
- ◆ Covington A. (1997). *Modern tanning chemistry*. *Chemistry Society Review*. 26, 111-126.
- ◆ Dumitraşcu M, Meltzer V, Sima E, Virgolici M, Alibu M, Ficai A, Moise V, Minea R, Vancea C, Scarişoreanu A, Scarlat F. (2011). Characterization of electron beam irradiated collagen-polyvinylpyrrolidone (PVP) and collagen-dextran (DEX) blends. *Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 6, 1793-1803.
- ◆ Furuzawa J, Cabral A, Zapata M, Alcocer J. (2003). Subcutaneous administration of polymerized-type I collagen for the treatment of patients with rheumatoid arthritis, an open-label pilot trial. *Journal of Rheumatology*. 30, 256-259.
- ◆ Furuzawa J, Fenutria R, Gil V, Lozano F, Teliz M, Romero C, Alcocer J. (2006). Polymerized-type I Collagen for the treatment of patients with rheumatoid arthritis. Effect of intramuscular administration in a double blind placebo-controlled clinical trial. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 24, 514–520.
- ◆ Furuzawa J, Rojas E, Valverde M, Castillo I, Díaz L, Kröttsch E. (2003). Cellular and humoral responses to collagen-polyvinylpyrrolidone administered during short and long periods in humans. *Can Journal Physiology Pharmacology*. 81, 1029-1035.
- ◆ Gonzalez R, Orillo J, Feijo J, Noris K, Perea R, López J. (2007). Estudio de mezclas de polietileno de alta densidad (PEAD) con colágeno/acetato de sodio e Hidroxiapatita (HA). *IFMBE Proceedings*. 18, 676-680.

- 
- ◆ Griffiths P, Haseth J. (2007). Fourier Transform Infrared Spectrometry. Wiley Interscience, Hoboken, USA.
  - ◆ Horikoshi S, Hisao H, Nick S. (2001). Photocatalyzed degradation of polymers in aqueous semiconductor suspensions V. Photomineralization of lactam ring-pendant polyvinylpyrrolidone at titania/water interfaces. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 138, 69–77.
  - ◆ Hulmes D. (2002). Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *Journal of Structural Biology*. 137, 2–10.
  - ◆ Kadler K, Baldock C, Bella J, Boot R. (2007). Collagens at a glance. *Journal of Cell Science*. 120, 1955–1958.
  - ◆ Kjaer M. (2004). Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiology Review*. 84, 649–698.
  - ◆ Krötzsch E, Furuzawa J, Reyes R, Quiróz E, Díaz L. (1998). Cytokine expression is down regulated by collagen-polyvinylpyrrolidone in hypertrophic scars. *Journal Investigative Dermatological*. 111, 828–834.
  - ◆ Krötzsch F. (1992). Método modificado para extracción de colágena nativa a partir de piel de ovino no-nato. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México DF.
  - ◆ Leyva G, Lima E, Krötzsch G, Pacheco R, Rodríguez N, Quintanar D, Krötzsch E. (2014). Physicochemical and Functional Characterization of the Collagen-Polyvinylpyrrolidone Copolymer. *Journal of Physical Chemistry*. 118, 9272–9283.
  - ◆ Li Shu-Tung. (1994). Gamma-Irradiation of reconstituted collagen matrices with different water contents: Implications in implantable device develop. The 20th Annual Meeting of the Society for Biomaterials.
  - ◆ Lie M, Changyou G, Zhengwei M, Jie Z, Jiacong S, Xueqing H, Chunmao H. (2003). Collagen/chitosan porous scaffolds with improved bioestability for skin tissue engineering. *Biomaterials*. 24, 4833–4841.
  - ◆ Liu B, Harrell R, Davis R, Dresden M, Spira M. (1989). The effect of gamma irradiation on injectable human amnion collagen. *Journal of Biomedical Research*. 23, 833–834.
  - ◆ Lodish H, Berk U, Zipursky. (2000). *Biología molecular de la célula*, 4ª edición. Nueva York: WH Freeman.
  - ◆ López T, Krötzsch E, Ortiz E, Álvarez M, Balsadella E, Martínez J, Odriozola J. (2009). Release properties and acute biosecurity determination of collagen-polyvinylpyrrolidone loaded in ordered mesoporous silica. *Key Engineering Materials*. 391, 169–184.
  - ◆ Myllyharju J, Kivirikko K. (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet*. 20, 33–43.
  - ◆ Paradis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer W, Chapman L, Lockey C, Onions D, Otto E. (1999). Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science (Washington, D.C)*. 285, 1236–1241.
-

- 
- ◆ Penilla I, Marín Ma, Kröttsch E. (2008). Efectos de la mezcla de colágena-PVP, sobre el metabolismo y proliferación celular de fibroblastos gingivales humanos cultivados. *Revista Odontológica Mexicana*. 12, 184-191.
  - ◆ Robinson B, Sullivan F, Borzeffeca J, Schwartz S. (1990). *PVP, a Critical. Review of the Kinetics and Toxicology of Polyvinylpyrrolidone (Povidone)*.USA: Lewis Publishers. 147-149.
  - ◆ Robinson B, Sullivan F, Borzeffeca J. (1990). *PVP*. Lewis Publishers, INC. Michigan.
  - ◆ Schultz R, Liebman M. (1992). *Proteíns: Composition and structure*. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. Ed. T.M.Devlin. 26-77.
  - ◆ Sionkowska A, Planecka A, Kozłowska J, Skopinska J. (2009). Collagen fibril formation in poly (vinyl alcohol) and poly (vinyl pirrolydone) films. *Journal of Molecular Liquids*. 144,71-74.
  - ◆ Urry D, Harris R, Long M. (1998). Irradiation crosslinking of the polytetrapeptide of elastin and compounding to dacron to produce a potential prosthetic. *Journal of Biomedical Materials Research*. 16, 11-16.
  - ◆ Woessner JF. (1961). The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 93, 440-447.
  - ◆ Yadavalli V, Svintradze D, Pidaparti R. (2010). Nanoscale measurements of the assembly of collagen to fibrils. *International Journal of Biological Macromolecules*. 46, 458-464.
  - ◆ Consulta de tablas espectroscópicas para la elucidación de espectros RMN. <http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/Handouts/nmr-h/hdata.htm>

## IX. ANEXOS.

La tabla i, proporciona información sobre la composición de la espina dorsal de la cadena, el montaje molecular y supramolecular además de la patología de los tipos de colágena que se conocen.

Tabla i.

Tipo	Composición de la cadena	Moléculas	Patología
I	$\alpha 1(I), \alpha 2(I)$	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I);$ $[\alpha 1(I)]_3$	Osteogénesis imperfecta I-IV, síndrome de Ehlers-Danlos (VIIA, VIIB)
II	$\alpha 1(II)$	$[\alpha 1(II)]_3$	Acondrogénesis II, Hipocondrogénesis, espondiloepifisaria, displasia congénita, displasia kniest, inicio tardío de displasia espondiloepifisaria, displasia Stickler
III	$\alpha 1(III)$	$[\alpha 1(III)]_3$	tipo vascular del síndrome de Ehlers-Danlos, tipo de hipermovilidad del síndrome de Ehlers-Danlos (raro), aneurisma de la aorta familiar
IV	$\alpha 1(IV), \alpha 2(IV),$ $\alpha 3(IV), \alpha 4(IV),$ $\alpha 5(IV), \alpha 6(IV)$	$[\alpha 1(IV)]_2 \alpha 2(IV);$ $\alpha 3(IV)$ $\alpha 4(IV)\alpha 5(IV);$ $[\alpha 5(IV)]_2 \alpha 6(IV)$	síndrome de Alport, hematuria familiar benigna
V	$\alpha 1(V), \alpha 2(V),$ $\alpha 3(V), \alpha 4(V)$ (rata)	$[\alpha 1(V)]_2 \alpha 2(V);$ $[\alpha 1(V)]_3;$ $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$	Tipo clásico de síndrome de Ehlers-Danlos
VI	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI),$ $\alpha 3(VI)$	$\alpha 1(VI) \alpha 2(VI),$ $\alpha 3(VI)$	miopatía de Bethlem, distrofia muscular ulrica congénita
VII	$\alpha 1(VII)$	$[\alpha 1(VII)]_3$	Epidermólisis bullosa distrófica
VIII	$\alpha 1(VIII),$ $\alpha 2(VIII)$	$[\alpha 1(VIII)]_2 \alpha 2(VIII)$ $[\alpha 1(VIII)]_3$ $[\alpha 2(VIII)]_3$	Distrofia de cornea endotelial de Fuchs.
IX	$\alpha 1(IX), \alpha 2(IX),$ $\alpha 3(IX)$	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	Displacia epifisaria múltiple.
X	$\alpha 1(X)$	$[\alpha 1(X)]_3$	Condrodisplasia metafisaria de Schmid.
XI	$\alpha 1(XI), \alpha 2(XI),$ $\alpha 3(XI)$	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	Síndrome de Stickler tipo II, síndrome de Marshall
XII	$\alpha 1(XII)$	$[\alpha 1(XII)]_3$	-
XIII	$\alpha 1(XIII)$		-
XIV	$\alpha 1(XIV)$	$[\alpha 1(XIV)]_3$	-
XV	$\alpha 1(XV)$		-
XVI	$\alpha 1(XVI)$		-

XVII	$\alpha 1(XVII)$	$[\alpha 1(XVII)]_3$	Epidermólisis bullosa atrofia generalizada benigna, unión de epidermólisis bullosa localizada.
XVIII	$\alpha 1(XVIII)$		Síndrome de Knobloch.
XIX	$\alpha 1(XIX)$		-
XX	$\alpha 1(XX)$		-
XXI	$\alpha 1(XXI)$		-
XXII	$\alpha 1(XXII)$		-
XXIII	$\alpha 1(XXIII)$		-
XXIV	$\alpha 1(XXIV)$		-
XXV	$\alpha 1(XXV)$		-
XXVI	$\alpha 1(XXVI)$		-
XXVII	$\alpha 1(XXVII)$		-

La tabla ii, presenta los aminoácidos contenidos en la colágena tipo I en la piel humana.

Aminoácido	% del total de Colágena (piel humana)
<i>Aminoácidos comunes</i>	
Alanina	11
Argirina	5
Aspartato	
Asparagina	5
Cisteína	0
Glutamato	7
Glutamina	
Glicina	33
Histidina	0.5
Isoleucina	1
Leucina	2
Lisina	3
Metionina	0.6
Fenilalanina	1
Prolina	13
Serina	4
Treonina	2
Triptófano	2
Tirosina	0.3
Valina	2
<i>Aminoácidos derivados</i>	

---

3-Hidroxi prolina	0.1
4-Hidroxi prolina	9
5-Hidroxi lisina	0.6

Los números en rojo ponen en relieve diferencias importantes en la composición de aminoácidos.