



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA**

“OBTENCIÓN DE CARTÍLAGO A PARTIR DE COLÁGENO”

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

**PRESENTA:
I.Q. PHILL SKEWES CASTAÑEDA**

**TUTOR PRINCIPAL
M. EN I.Q. ALICIA DEL REAL LÓPEZ
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA, U.N.A.M.**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. AFREDO MACIEL CERDA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES, U.N.A.M.
DRA. LUZ MARÍA LÓPEZ MARÍN
CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA, U.N.A.M.**

MÉXICO, D.F., NOVIEMBRE 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.

RESUMEN

La ciencia de los biomateriales enfrenta diversos desafíos relacionados con el reemplazo de las partes que conforman al cuerpo humano, tal como es el caso del cartílago, el cual se rompe o desgasta debido a esfuerzos continuos y excesivos a los que es sometido diariamente ocasionando problemas de salud, es por ello que la investigación de los biopolímeros se ha enfocado en la obtención y desarrollo de nuevos materiales que cumplan con esta finalidad.

En el presente trabajo fueron sintetizados un grupo de copolímeros a base de 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) en presencia de colágeno con el fin de obtener un material polimérico que asemejara en lo posible al cartílago humano teniendo como función principal el reemplazo del mismo. El colágeno utilizado para la síntesis de cada copolímero fue extraído mediante el método de tratamiento ácido, en donde se utilizó ácido acético, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), pepsina y orejas de cerdo como fuente de extracción, además de hidróxido de sodio para regular el pH durante el proceso. La síntesis del copolímero 2-hidroxietilmetacrilato en presencia de colágeno, se llevó a cabo por reacción de polimerización vía radicales libres en solución acuosa, se utilizó 2,2-azobisisobutironitrilo (AIBN) como iniciador, manteniendo la reacción a una temperatura de 75°C y se varió la cantidad de colágeno para cada copolímero sintetizado en repetidas ocasiones. Al transcurrir la reacción, se trasladó al copolímero en moldes de vidrio al interior de un horno a 75°C durante 1 hora y finalmente fue irradiado con una lámpara de luz ultravioleta por 24 horas para asegurar la terminación de la reacción de polimerización.

Los materiales sintetizados, tal como el pHEMA, los copolímeros pHEMA-g-colágeno y el colágeno extraído fueron caracterizados mediante las técnicas de Espectroscopia de Infrarrojo (FT-IR), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Análisis Termogravimétrico (TGA) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). También fue aplicada únicamente para el colágeno la técnica de caracterización de Electroforesis en Gel (SDS-PAGE). Los resultados observados en cada una de las técnicas mencionadas, muestran diferencias de un material con respecto a otro, tal como son el ensanchamiento o movimiento de bandas, variación de puntos térmicos y cambio de apariencia; al realizar el análisis a fondo de los resultados, estos indican que existe evidencia suficiente para demostrar que se llevó a cabo la formación del injerto entre el HEMA y el colágeno. Finalmente el pHEMA y los copolímeros pHEMA-g-colágeno fueron sometidos a pruebas mecánicas de compresión, en donde se observó que a mayor cantidad de colágeno contenido en los injertos, el material tiende a disminuir su resistencia a la compresión, característica que puede ser aprovechada para la finalidad a la cual está destinado el material obtenido.

Palabras clave: Colágeno, 2-hidroxietilmetacrilato, polimerización y cartílago.

ABSTRACT

The science of biomaterials faces various challenges related to the replacement of the parts that make up the human body, as is the case of the cartilage, which breaks or wears out due to excessive and continuous efforts to which is subjected daily causing health problems, so that the biopolymer research has focused on the breeding and development of new materials that comply this purpose.

In the present work were synthesized to group of copolymers based on 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA) in the presence of collagen in order to obtain a polymeric material that will resemble to the greatest extent possible at the human cartilage taking as main function the replacement of the same. The collagen used for the synthesis of each copolymer was extracted by acid treatment method, where was used acetic acid, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pepsin and pig's ears as a source of extraction, in addition to sodium hydroxide to adjust the pH during the process. The synthesis of the copolymer 2-hydroxyethylmethacrylate in the presence of collagen, was carried out by a reaction of polymerization via free radicals in aqueous solution, used 2-2-azobisisobutyronitrile (AIBN) as the initiator, while maintaining the reaction at a temperature of 75 °C and was varied the amount of collagen copolymer synthesized for each on repeatedly occasions. After the reaction, moved the copolymer in molds of glass inside of an oven at 75 °C for 1 hour and finally was irradiated with a UV lamp for 24 hours to ensure the completion of the polymerization reaction.

The synthesized materials, such as the pHEMA and pHEMA-g-collagen copolymers and extracted collagen were characterized using the techniques of Infrared Spectroscopy (FT-IR), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetric Analysis (TGA) and Scanning Electron Microscopy (SEM). Also was applied only for collagen technique of characterization of electrophoresis in Gel (SDS-PAGE). The results observed in each of the above mentioned techniques, show differences of one material with respect to another, such as widening or movement of bands, variation of thermal points and change of appearance; to carry out the in depth analysis of the results, these indicate that there is sufficient evidence to show that between the HEMA and the collagen graft formation took place. Finally the pHEMA and pHEMA-g-collagen copolymers were subjected to mechanical compression tests, where it was noted that more collagen content in grafts, the material tends to decrease its resistance to compression, feature that can be used for the purpose for which the material obtained is intended.

Keywords: 2-hydroxyethylmethacrylate, collagen, polymerization, and cartilage.



*A mi familia y amigos.
“La felicidad no es el fin... es el camino”*

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi entero agradecimiento a las siguientes personas e instituciones que con su valiosa participación y gran apoyo fue posible la realización de este trabajo:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT, por impulsar y fortalecer el desarrollo científico en México, contribuyendo en la generación, adquisición y difusión del conocimiento a nivel internacional, así como por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de posgrado.

Al PAEP-UNAM 2013 por el apoyo otorgado para asistir al International Materials Research Congress 2013 en donde fue expuesto el presente trabajo, por el apoyo para poder realizar visitas de campo al Instituto de Investigaciones en Materiales y para la compra de material de laboratorio necesario en el proyecto.

A la M. en I.Q. Alicia Del Real López por todas las enseñanzas impartidas, la confianza y la oportunidad que me brindó para poder realizar el presente trabajo.

Al Dr. Alfredo Maciel Cerda y la Dra. Luz María López Marín por las valiosas aportaciones teórico-prácticas que enriquecieron el desarrollo del presente trabajo siendo miembros de mi comité tutor.

A la Dra. Blanca Edith Millán Chiu por la asesoría y apoyo brindado durante la realización de la técnica de electroforesis SDS-PAGE.

A la Dra. María De La Luz Zambrano Zaragoza y al I.Q. Ernesto Sánchez Colín por el apoyo brindado durante la realización de los ensayos de pruebas mecánicas.

Al Dr. Emilio Bucio Carrillo y la Q.F.B. Damaris Cabrero Palomino por el apoyo brindado durante las técnicas de DSC y TGA.

Al Dr. Domingo Rangel Miranda, Dr. Gabriel Nava Pinto y al Q.M. Antonio Loeza Herrera por el apoyo brindado en instrumentación y equipo de laboratorio.

A la Lic. Teresa De Jesús Pérez Cruz por el apoyo brindado en la búsqueda especializada de documentación y servicios bibliotecarios.

A la Q. Natalia Rincón Londoño por el apoyo brindado durante la obtención de los espectros FTIR y por todo lo compartido durante esta etapa.

A todos los profesores del Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de los cuales recibí enseñanzas valiosas para mi formación profesional.

A mis padres Atala y Franz por toda una vida predicando con el buen ejemplo, llena de amor, comprensión y de infinitas enseñanzas a lo largo de mi existencia.

A mis hermanos Franz, Vladimir y Elizabeth por todos los momentos tan felices que hemos compartido en este camino.

Al I.Q. Mario Alberto López Mendoza por mostrarme lo que es una verdadera amistad y por el apoyo incondicional día a día.

A María De Los Ángeles López Domínguez por estar en todo momento presente en mi vida como una segunda madre y gran amiga.

A todos mis amigos y aquellas personas que contribuyeron de alguna manera a la realización de este trabajo y a que siga creyendo en convertir este mundo en un lugar mejor a través de la ciencia y el conocimiento.

¡Gracias totales!

Resumen	2
Abstract	3
Dedicatoria	4
Agradecimientos	5

CAPÍTULO 1

1	Introducción	9
2	Objetivos e Hipótesis	12
	2.1 Objetivo general	
	2.2 Objetivos particulares	
	2.3 Hipótesis	
3	Antecedentes	13
4	Fundamentos teóricos	16
	4.1 Polímeros	
	4.2 Clasificación de los polímeros	
	4.3 Mecanismos de polimerización	
	4.4 Procesos de polimerización	
	4.5 Copolímeros	
	4.6 Biopolímeros	
	4.7 Proteínas y aminoácidos	
	4.8 Colágeno	
	4.9 Cartílago	
5	Técnicas de caracterización	43
	5.1 Electroforesis en gel (SDS-PAGE)	
	5.2 Espectroscopia Infrarroja (FTIR)	
	5.3 Análisis Termogravimétrico (TGA)	
	5.4 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	
	5.5 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	
	5.6 Pruebas Mecánicas	

CAPÍTULO 2

6	Metodología experimental	54
6.1	Material	
6.2	Extracción de colágeno	
6.3	Síntesis del copolímero pHEMA-g-colágeno	
6.4	Técnicas de caracterización	
6.4.1	Electroforesis en gel (SDS-PAGE)	
6.4.2	Espectroscopia Infrarroja (FTIR)	
6.4.3	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	
6.4.4	Análisis Térmico: Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	
6.4.5	Ensayo de compresión	

CAPÍTULO 3

7	Análisis y discusión de resultados	64
7.1	Electroforesis en gel (SDS-PAGE)	
7.2	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	
7.3	Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR)	
7.4	Análisis Termogravimétrico (TGA)	
7.5	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	
7.6	Ensayo de compresión	

CAPÍTULO 4

8	Conclusiones	92
9	Perspectiva	94
10	Referencias bibliográficas	95

CAPÍTULO 1

1 INTRODUCCIÓN

El ser humano requiere de movilidad física en la vida diaria para poder interactuar con el medio que lo rodea y realizar sus actividades. El aparato locomotor dependiente del sistema nervioso, es el encargado de proveer sostén, protección y movilidad al cuerpo humano [1], Una parte fundamental del aparato locomotor son las articulaciones, las cuales se encuentran formadas por huesos, músculos, ligamentos y cartílago. Es indispensable que cada una de estas partes del cuerpo se encuentre en buen estado para llevar a cabo su correcto funcionamiento (Figura 1) [2]. La degeneración de las articulaciones en las personas es muy común, los defectos condrales u osteocondrales, es decir, relativos al cartílago son el resultado de aplicar fuerzas excesivas indebidas, permanecer en una posición inadecuada, la actividad física cotidiana, efectos hormonales, el deporte, la edad y una mala alimentación[3]. Estos defectos tienden a evolucionar con el tiempo, ocasionando procesos degenerativos como la osteoartritis (Figura 1), la cual comienza con el desgaste del cartílago, hasta la deformación de los huesos limitando la movilidad [4] y causando dolor [5].

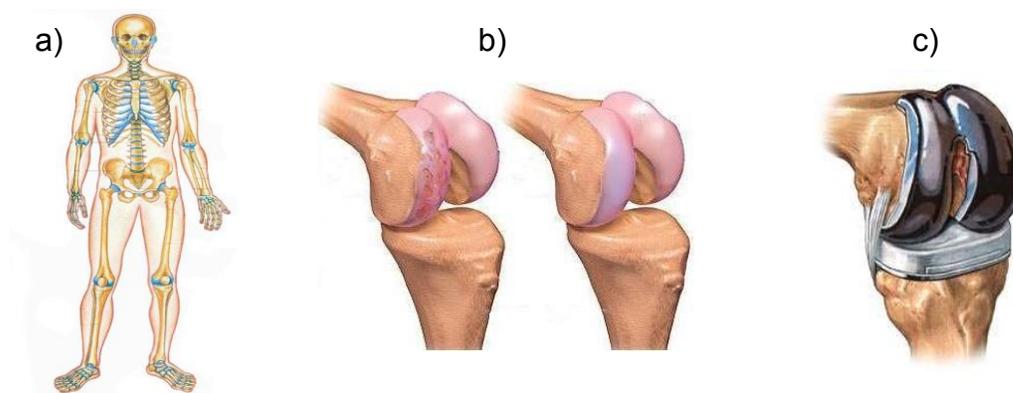


Figura 1. a) Cartílago humano, Osteoartritis, Prótesis de rodilla.

Actualmente existe gran interés crear biomateriales que puedan ser usados en la reparación de las lesiones de las articulaciones, especialmente en el cartílago ya que siendo avascular carece de capacidad para regenerarse rápidamente [6]. Los pacientes con una lesión condral grave son tratados generalmente con células madre [7] que ayudan a regenerar el cartílago, también mediante aloinjertos, la sustitución total de la articulación con una prótesis de metal-polímero (figura 1) [8], o bien mediante implantes artificiales de materiales cerámicos, poliméricos o metálicos [9] como: hidroxiapatita, poliuretano o titanio [10].

Los biomateriales son materiales biológicos farmacológicamente inertes, utilizados para ser incorporados o implantados dentro de un organismo vivo, con el fin de tratar, aumentar, reemplazar o restaurar algún tejido u órgano del cuerpo humano. Durante muchos años los metales y las aleaciones constituyeron la única forma de biomateriales en uso, hasta el desarrollo de los materiales cerámicos y poliméricos como biomateriales [11]. Durante la segunda guerra mundial se produjo un rápido avance en la ciencia de los biopolímeros, abarcando desde la liberación de fármacos hasta la regeneración de tejido óseo y cartilaginoso; también reemplazaron a otros materiales en aplicaciones médicas, como en la sustitución de catéteres metálicos e implantes estéticos (Figura 2) [12]. En la actualidad el uso de los biopolímeros ha ido aumentando dentro del campo de la medicina, ya que estos mejoran y/o compiten en costo-beneficio con otros materiales ya existentes como los materiales cerámicos y metálicos [13]. El poliuretano, siliconas, polimetilmetacrilato, policaprolactona y el alcohol polivinílico son ejemplos de polímeros sintéticos que junto con los polímeros naturales tal como las proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y politerpenos poseen un gran potencial en aplicaciones médicas debido a la biocompatibilidad que estos presentan. [14].



Figura 2. Biomateriales: implante de seno, prótesis dental, ocular y auricular.

El 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) es el monómero del cual se obtiene el poli hidroxietilmetacrilato pHEMA, polímero que puede absorber grandes cantidades de agua siendo insoluble en esta, sufre un hinchamiento debido a la parte hidrofílica que posee y forma un hidrogel [15]. Dependiendo de la estructura fisicoquímica el pHEMA es capaz de absorber más del 100% de agua relativa a su peso en seco, debido a esto y por las propiedades mecánicas y de biocompatibilidad que presenta este polímero es uno de los biomateriales más importantes con aplicaciones médicas actualmente [16]. El colágeno a su vez es una proteína en forma de triple hélice integrada por fibras de largas cadenas de aminoácidos unidas por enlaces peptídicos y puentes de hidrogeno que lo hacen resistente a esfuerzos de compresión, tensión y a la vez flexible (Figura 3) [17], siendo la proteína más abundante en la piel, huesos y cartílago de la mayoría de los seres vivos. La implantación de colágeno en el cuerpo tiene resultados favorables debido a que el cuerpo mismo lo reconoce y acepta, ha sido estudiado desde hace muchos años ampliamente para fines cosméticos y médicos (Figura 4) [18].

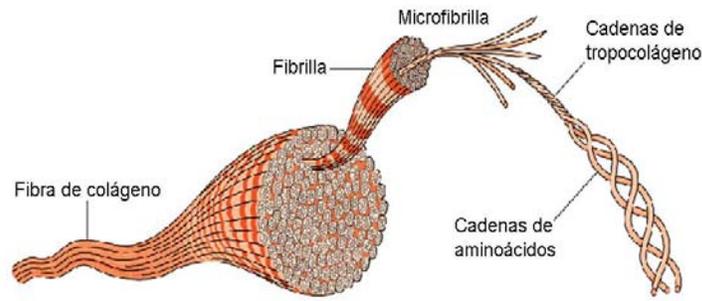


Figura 3. Fibra de colágeno.

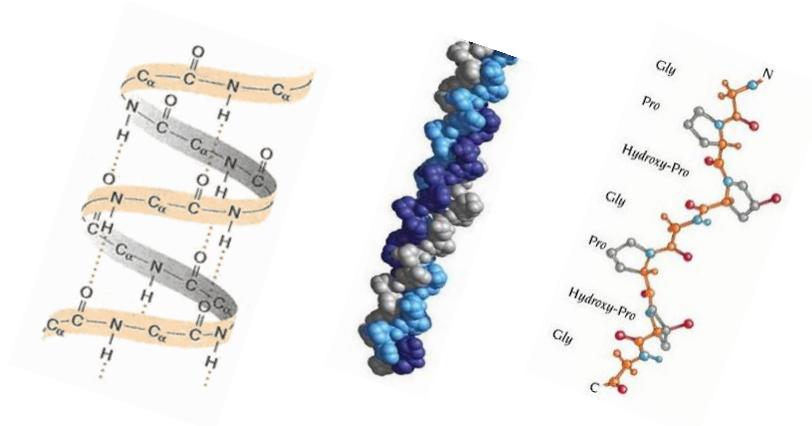


Figura 4. Estructura del colágeno.

El HEMA y el colágeno son polímeros que han sido motivo de numerosos estudios a lo largo de los años [19], los cuales han sido utilizados en conjunto para crear compuestos con aplicaciones que van desde la creación de cultivos celulares o tejido, hasta el desarrollo de sistemas de liberación de proteínas, implantes de hueso o cartílago, lentes de contacto entre otras aplicaciones médicas, estos materiales son biocompatibles y presentan buenas propiedades mecánicas y fisicoquímicas dentro del campo de la medicina [20]. La investigación realizada en este trabajo trata de aprovechar las propiedades del 2-Hidroxietilmetaacrilato y del colágeno para desarrollar el copolímero de injerto pHEMA-g-colágeno, el cual posee alta biocompatibilidad y propiedades mecánicas adecuadas para aplicaciones médicas [21].

El copolímero obtenido en este trabajo tiene como objetivo final ser utilizado como reemplazo de tejido cartilaginoso, aunque en base a los estudios realizados previamente y mencionados en las referencias bibliográficas puede anticiparse que posee más aplicaciones dentro del campo de la medicina. [22].

2 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo general:

Crear un cartílago sintético mediante la obtención del copolímero de injerto pHEMA-g-colágeno a partir de la síntesis del 2-hidroxietilmetaacrilato (HEMA) en presencia de colágeno por reacción de polimerización vía radicales libres, posteriormente realizar las caracterizaciones y pruebas mecánicas correspondientes de cada material.

2.2 Objetivos particulares:

- a) Llevar a cabo un método de extracción de colágeno a partir de orejas de cerdo.
- b) Aplicar la técnica de Electroforesis en Gel (SDS-PAGE) al colágeno extraído para calcular el peso molecular del mismo como referencia inicial.
- c) Efectuar la síntesis del copolímero pHEMA-g-colágeno por reacción de polimerización vía radicales libres en solución acuosa a partir de HEMA en presencia de colágeno, variando la cantidad de este último durante cada reacción de polimerización.
- d) Realizar la caracterización del colágeno, pHEMA y copolímeros pHEMA-g-colágeno mediante la técnica de análisis de Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR) con la cual puede ser observada la formación del injerto al analizar la variación de las bandas características de cada material; por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) donde puede ser observada la morfología de cada material; por Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) donde puede ser observada la variación de los puntos térmicos de los materiales, lo cual ayuda a demostrar la formación del injerto entre el HEMA y el colágeno.
- e) Evaluar el comportamiento mecánico del pHEMA y de los copolímeros pHEMA-g-colágeno mediante la realización de pruebas mecánicas de compresión y comparar los resultados obtenidos en estas con el cartílago humano.

2.3 Hipótesis:

El copolímero pHEMA-g-colágeno puede ser obtenido por polimerización vía radicales libres a partir del 2-hidroxietilmetaacrilato en presencia de colágeno. Al ser biocompatibles estos dos materiales con el cuerpo humano y debido a las propiedades mecánicas que presenta el pHEMA inicialmente, convierten al copolímero pHEMA-g-colágeno en un material con posibles propiedades para ser utilizado como reemplazo del cartílago humano.

3 ANTECEDENTES

A lo largo de la historia los polímeros preparados a partir del 2-Hidroxietilmetacrilato (HEMA) y de colágeno han sido estudiados en algunas ocasiones, en 1960 Witcherle O. y Lim D. utilizaron por primera vez al HEMA como un biomaterial debido a que encontraron que este poseía un carácter permeable y biocompatible frente al cuerpo humano, después de cuatro años de estudio y de realizar numerosas pruebas con el material, concluyeron que el HEMA podía ser manipulado fácilmente y polimerizado para la creación de lentes de contacto [23].

Posteriormente siguieron estudios como el realizado por Sanjiv Bhatia y Peter R. Bergethon en donde utilizaron al pHEMA como una prótesis duradera, realizando pruebas in vivo en conejos y ratones observando que el pHEMA es un polímero biocompatible, estable, de fácil preparación, esterilizable, moldeable y económico al compararlo con otros materiales utilizados en prótesis. También propusieron que podía ser utilizado para la creación de un sistema de control en la liberación de fármacos y así mismo para el crecimiento de tejido muscular [24].

A partir de estos primeros estudios realizados el HEMA entro en auge siendo ampliamente estudiado a lo largo de mundo, principalmente por su impacto en aplicaciones médicas. Patrick Sharrock y Genevieve Gregoire realizaron pruebas del HEMA en la desmineralización de la dentina, encontrando que el HEMA posee afinidad con el colágeno y la lisina formando una red peptídica, por lo que puede ser utilizado para problemas de superficie dental [25].

K. Gelse y E. Poschl realizaron estudios de la funcionalidad del colágeno en el organismo, proponiendo que la incorporación de este material en los biomateriales utilizados en la industria alimenticia, médica y cosmética podía tener resultados interesantes [26]. R. Jeyanthi y K. Panduranga propusieron en 1990 que la incorporación de materiales biológicos tal como el colágeno en hidrogel de HEMA podía dar buenos resultados de esfuerzos mecánicos y de tolerancia frente a tejidos o adhesión celular in vitro e in vivo, en sus experimentos encontraron que a mayor cantidad de colágeno en el copolímero de HEMA-colágeno la resistencia y estabilidad física del hidrogel tendían a disminuir, pero la biocompatibilidad se incrementaba, características que pueden permitir la creación de copolímeros para la liberación de fármacos anticancerígenos [27].

M. Stol, Cífková, V. Tyrácková y M. Adam realizaron implantes de pHEMA con colágeno en ratas observando que el pHEMA presenta una biodegradación muy baja permaneciendo prácticamente sin modificación a lo largo de los años, mientras que los implantes de colágeno son reconocidos por el cuerpo y absorbidos aportando beneficios en funciones de regeneración, fortalecimiento y reparación de tejido óseo, cartilaginoso y de la piel [28].

Entre los estudios previos más destacados en relación al presente trabajo con respecto a la creación de copolímeros de pHEMA-colágeno destacan los siguientes:

Linda Civerchia-Perez y Bárbara Faris quienes prepararon hidrogeles de pHEMA-colágeno por polimerización del HEMA en presencia de colágeno a varias concentraciones, resultando hidrogeles transparentes que fueron evaluados para crecimiento de células IMR-90, en los cuales obtuvieron resultados que muestran que sin colágeno en los copolímeros no hay crecimiento celular y a su vez a mayor concentración de colágeno en los mismos, ocurrió un mayor crecimiento celular o adhesión al material [29].

M. Falconi y G. Teti realizaron estudios de fibroblastos gingivales humanos expuestos a distintas concentraciones de HEMA con colágeno y caracterizados por medio de SEM para evaluar diferencias celulares antes y después del tratamiento dental en donde fue utilizado el HEMA con colágeno como adhesivo dental, observando una modificación significativa en la morfología favorecida por la presencia del colágeno de tipo 1 [30].

T.P. Sastry y K. Panduranga Rao obtuvieron un grupo de copolímeros de colágeno amniótico y pHEM. El colágeno amniótico fue entrecruzado con glutaraldehído y copolimerizado con 2-hidroxietilmetacrilato en presencia de peróxidos en un cuarto de temperatura y por medio de membranas, el copolímero fue caracterizado para cada porcentaje injertado mediante espectroscopia de infrarrojo, ensayo mecánico y absorción acuosa, se encontró en este estudio que este tipo de injertos puede tener potenciales aplicaciones en el recubrimiento de membranas amnióticas [31].

K. Smetana Jr. y M. Stol, realizaron la implantación de copolímeros de pHEMA-colágeno en hueso, en donde fueron comparadas las propiedades biológicas del pHEMA, del colágeno y de los compuestos pHEMA-colágeno por medio de rayos X al ser implantados en un fémur de cerdo con el fin de analizar la biodegradación de los materiales al formar hueso nuevo [32].

R. Jeyanthi y K. Panduranga Rao, estudiaron la biocompatibilidad in vivo de un hidrogel a base de pHEMA-colágeno, el cual fue implantado subcutáneamente en ratas por más de seis meses y estudiado histopatológicamente indicando la reacción del tejido. Se observó que no hubo presencia de necrosis, calcificación o infección en la rata, por lo que los hidrogeles fueron considerados altamente biocompatibles [33].

M. Stol. Realizó modificaciones al gel de pHEMA que obtuvo en estudios anteriores [6], cambió las propiedades de este con la adición de colágeno formando esponjas al mezclar los compuestos en solución, el nuevo gel fué evaluado por por medio de pruebas in vitro obteniendo buenos resultados en el crecimiento de células musculares y alta biocompatibilidad [34].

M. Stol, M. Tolart y M. Adam desarrollaron un método para crear un sustrato de pHEMA mezclado con colágeno para cultivar células de embriones de pollo mediante miogénesis, en donde se encontró que el hidrogel obtenido fue mecánicamente estable en forma de películas o discos para cajas petri y biológicamente activos favoreciendo el crecimiento celular muscular in vitro [35], posteriormente Miroslav Stol y Karel Smetana realizaron modificaciones a este procedimiento para nuevamente promover el uso de estos materiales en el crecimiento celular obteniendo buenos resultados [36]. También K. Stastny, K. Hora y M. Stol han utilizado los materiales obtenidos en sus estudios previos en cirugías maxilofaciales y tratamientos como fracturas ampliando así el campo de aplicación de estos materiales en la medicina [37].

Jyoti K. Rao, D. Vijaya Ramesh y K. Panduranga Rao realizaron estudios con pHEMA y colágeno con el fin de obtener un hidrogel en donde pudiera ser controlado el tamaño de poro y el entrecruzamiento en el material por medio de soluciones de sulfato encontrando importantes diferencias en los procedimientos realizados [38].

S. Potorac y M. Popa han realizado estudios de copolimerización vía radicales libres entre el pHEMA y colágeno modificando el proceso de degradación del colágeno nativo con anhídrido itacónico, obtuvieron resultados que muestran una disminución en la degradación de este y proponen aplicaciones en la ingeniería de tejidos como el tratamiento de heridas cutáneas [39].

Entre otros estudios que se han realizado con pHEMA y distintos aditivos al colágeno, destacan el caso de la vitamina C en donde K. Kejllova y J. Labsky [18] recientemente encontraron que también resulta biocompatible y tolerante para el cuerpo humano, además de promover un efecto favorable frente a la irritación en la piel. También en estudios recientes llevados a cabo por Sheena Abraham y Sean Brahim se ha analizado el uso de los compuestos de pHEMA para la implantación de biochips en el cuerpo humano [19]. Sin embargo, según M. Santin, S.J. Huang pareciera que los compuestos de pHEMA siguen tendiendo a aplicaciones médicas para el crecimiento celular o creación de materiales híbridos [40].

4 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

4.1 Polímeros.

Los polímeros son compuestos de alto peso molecular o bien, macromoléculas constituidas por unidades repetitivas llamadas monómeros que forman cadenas largas que están unidas mediante enlaces iónicos, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van Der Waals y principalmente por enlaces covalentes.

El número de unidades de monómeros que constituye una cadena polimérica es conocido como el grado de polimerización. En algunos casos la repetición es lineal o puede tener ramificaciones o interconectadas formando retículos tridimensionales. Las cadenas con un pequeño número de unidades monoméricas son llamadas oligómeros, y regularmente su grado de polimerización varía de dos a menos de diez unidades. Los polímeros sintéticos son obtenidos por reacciones de polimerización, las cuales transforman simples moléculas de tamaño pequeño llamados monómeros en una unión covalente de varias unidades monoméricas. A éste proceso se le conoce con el nombre de polimerización. Cuando un polímero es obtenido de la polimerización de diferentes moléculas monoméricas, exhiben diferente estructura molecular y es conocido como copolímero.

4.2 Clasificación de los polímeros.

Existen diversas maneras de clasificar a los polímeros, las más comunes son las siguientes:

Por la naturaleza: Natural y sintético.

Los polímeros naturales provienen directamente del reino animal o vegetal, tienen gran importancia biológica, algunos ejemplos de estos polímeros son las proteínas, tales como la queratina, elastina, ácidos nucleicos ADN y ARN, los polisacáridos almidón y celulosa.

Los polímeros sintéticos provienen de los procesos de polimerización controlados por el hombre, son generados a partir de materias primas de bajo peso molecular, por lo general son derivados del petróleo, algunos ejemplos de polímeros sintéticos son el poliestireno, polipropileno, cloruro de polivinilo, polietileno y nylon.

Por la estructura de las cadenas: Lineal, ramificado y entrecruzado (Figura 5).



Figura 5. Estructura de las cadenas poliméricas.

Por la estequiímica: Atáctico, sindiotáctico, isotáctico (Figura 6).

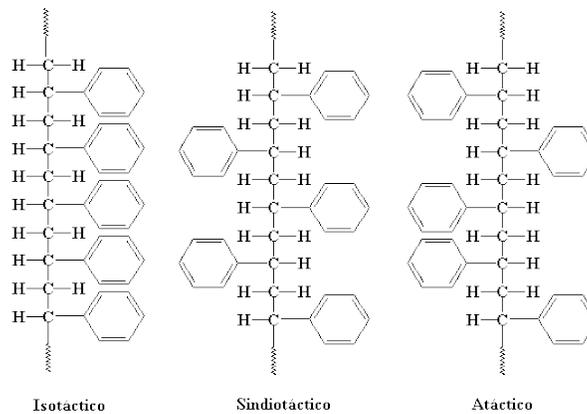


Figura 6. Estequiímica de los polímeros.

Por la composición monomérica: Homopolímero, copolímero, tripolímero, etc.

Los homopolímeros son polímeros constituidos por una unidad monomérica repetitiva, en cambio los copolímeros son obtenidos de la polimerización de dos o más diferentes monómeros y así sucesivamente.

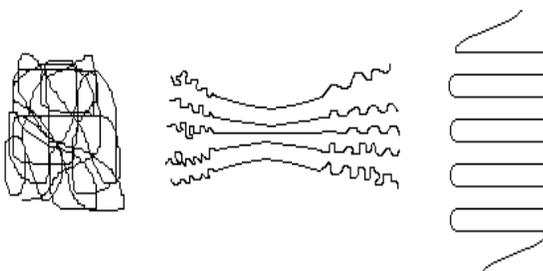
Por el comportamiento térmico: Termofijo, termolábil.

Los polímeros termolábiles se caracterizan por tener una excelente capacidad de deformación elástica, pueden conservar sus características particulares al ser fundidos y al ser enfriados.

Los polímeros termofijos son preparados generalmente a partir de sustancias semifluidas de peso molecular relativamente bajo, las cuales alcanzan un alto grado de entrecruzamiento molecular cuando se someten a procesos poliméricos especializados formando materiales duros, al fundir se descomponen o simplemente no funden, generalmente son insolubles en los solventes más usuales.

Por la cristalinidad: Amorfo, cristalinos y semicristalinos.

Los polímeros amorfos no tienen un orden específico en su estructura y son traslucidos; los polímeros semicristalinos poseen regiones orientadas llamadas cristalitas y regiones amorfas a su vez, por lo que desvían la luz; en el caso de los polímeros cristalinos o también llamados polímeros orientados contienen regiones sumamente ordenadas en tres dimensiones por lo que se ven opacos ([Figura 7](#)).



[Figura 7](#). Estructura amorfa, semicristalina y cristalina.

Por el tamaño de la molécula: Oligómero y polímero.

Los oligómeros tienen pesos moleculares inferiores a 1500 y longitudes de cadena inferiores a 50 Å, son solubles y pueden destilarse. Los polímeros tienen una longitud de cadena entre 50-500Å.

4.3 Mecanismos de polimerización.

Son las reacciones mediante las cuales se efectúa el crecimiento de la cadena, es decir, mecanismo por el cual se va formando el polímero al hacer reaccionar las unidades monoméricas que lo conforman. Existen dos mecanismos principales, polimerización por adición y polimerización por condensación.

Polimerización por condensación o reacción de etapas.

Es la formación de polímeros por mediación de reacciones químicas intermoleculares que normalmente implican más de una especie monomérica, cada monómero posee como mínimo dos grupos funcionales, uno en cada extremo de la molécula. Generalmente se origina un subproducto de bajo peso molecular que se elimina, como el agua. Las sustancias reactivas tienen fórmulas químicas diferentes de la unidad que se repite, y la reacción intermolecular ocurre cada vez que se forma una unidad repetitiva. Por ejemplo, la formación del nylon (Figura 8).

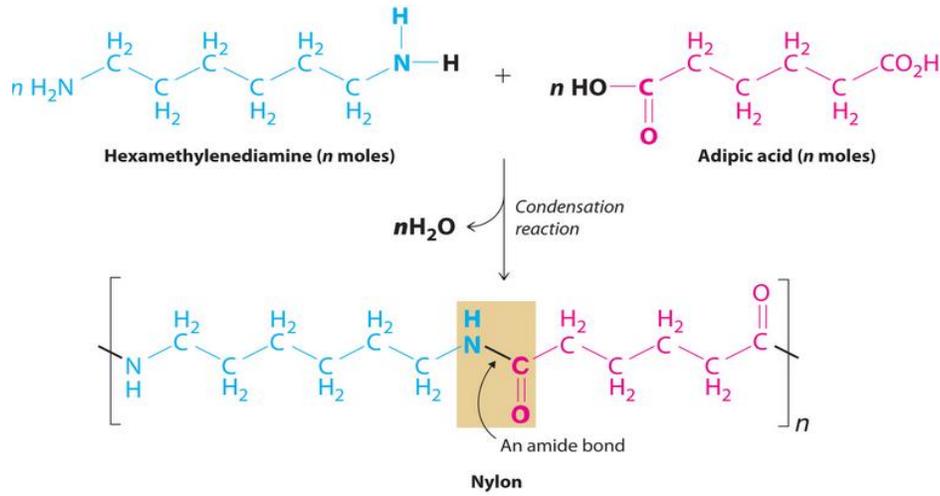


Figura 8. Polimerización por condensación: Formación del nylon.

Este proceso por etapas se repite sucesivamente y se pueden producir molécula lineal, entrecruzada o reticulada, dependiendo del número de grupos funcionales que contenga el monómero. Los tiempos de reacción para la polimerización por condensación son generalmente mayores que los de la polimerización por adición.

Polimerización de adición o reacción en cadena.

Los polímeros son formados a partir de la unión de unidades monoméricas no saturadas (generalmente alquenos o compuestos aromáticos), los polímeros se forman en este caso mediante la apertura del doble enlace, la unidad de repetición del polímero posee la misma composición química que el monómero del cual procede, por lo cual pasa a formar parte del polímero sin pérdida de átomos y sin formar subproductos. Los monómeros pasan a formar parte de la cadena de uno en uno, reaccionando solo estos con las cadenas que van en crecimiento. Primero forman dímeros, después trímeros, tetrameros y así sucesivamente.

Para llevar a cabo este mecanismo de polimerización es necesario un iniciador de reacción, el cual puede ser un radical libre (Figura 5) un ión catiónico o aniónico; derivándose de ahí el nombre de las polimerizaciones por adición. El método más importante y utilizado en la polimerización por adición es la polimerización por radicales libres.

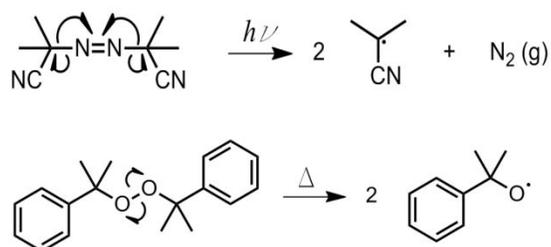


Figura 5. Formación de radicales libres por descomposición térmica del peróxido de dicumilo y fotólisis del 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN).

Como iniciador de este tipo de polimerizaciones actúan aquellas especies que son capaces de adicionarse al doble enlace del monómero. Según cual sea la naturaleza del iniciador, la apertura del doble enlace del monómero tendrá lugar de forma homolítica o heterolítica. En la rotura heterolítica se forma una especie activa iónicamente, es decir que le falta o tiene exceso uno o más electrones. Esto sucede cuando una de las especies es más electronegativa que la otra por lo que se quedará cargada negativamente, dejando a la otra cargada positivamente. En la rotura homolítica se forma un radical libre, que se produce cuando las electronegatividades de las sustancias son muy parecidas y se queda un electrón desapareado. Estas sustancias son muy inestables y tienden a reaccionar rápidamente.

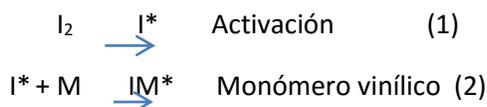
El mecanismo de la reacción (iónica y radical) depende de la especie que actúa como iniciador, pero también juegan un papel importante los radicales libres generados durante la polimerización, ya que estos determinan la estabilidad tanto del monómero como de los intermedios de la reacción. En una reacción en cadena se distinguen tres etapas principales: iniciación, propagación, y terminación.

Polimerización por radicales libres.

Su centro activo de propagación involucra radicales libres. Se emplea para sintetizar polímeros a partir de monómeros vinílicos, los cuales son pequeñas moléculas con dobles enlaces carbono-carbono (C=C). Los radicales libres pueden obtenerse mediante la descomposición térmica de los peróxidos orgánicos, hidroperóxidos o compuestos azo o diazo.

La cinética de reacción de la polimerización por radicales libres, describe la etapa de iniciación de una molécula (iniciador I), liberando radicales libres por ruptura homolítica de un enlace covalente (reacción de disociación).

Iniciación: Cuando se generan radicales libres en presencia de un monómero vinílico, el radical se adiciona al doble enlace con la producción de otro radical.



Esta etapa requiere de la formación de radicales libres reactivos que puedan adicionarse al monómero en la etapa de propagación. La mayor parte de los iniciadores en las polimerizaciones vinílicas, tienen una eficacia de 0-6 a 1.0, es decir, entre el 60 y el 100% de los radicales libres generan cadenas poliméricas. La baja eficacia de los radicales libres, se debe a la recombinación e inactivación entre ellos antes de comenzar la polimerización.

Una vez generados los radicales libres (I^*) procedentes de la descomposición del iniciador, se procede al ataque del radical libre al monómero. Lo importante de la etapa de iniciación de los monómeros vinílicos, es que la actividad radical pasa a estar localizada en el carbono de la unidad monomérica que contenía el doble enlace. Este centro activo monomérico es el que ataca de nuevo al monómero en las sucesivas etapas de propagación.

Propagación: Una vez generados los radicales libres (I^*) procedentes de la descomposición del iniciador, se procede al ataque del radical libre al monómero. Lo importante de la etapa de iniciación de los monómeros vinílicos, es que la actividad radical pasa a estar localizada en el carbono de la unidad monomérica que contenía el doble enlace. Este centro activo monomérico es el que ataca de nuevo al monómero en las sucesivas etapas de propagación.



Como consecuencia de las adiciones sucesivas, la cadena polimérica va creciendo por el extremo en el cual se encuentra situado el centro activo propagador, hasta que dicho centro se desactiva en la etapa final de terminación.

Terminación: La actividad del centro propagador se puede perder debido a que se unan dos centros activos de dos cadenas poliméricas crecientes o por la

interacción de alguna sustancia que ceda un halógeno o un hidrógeno al carbono activo de la cadena polimérica. La etapa de terminación puede tener lugar de dos formas:

Por combinación o acoplamiento:



Por desproporción:



4.4 Procesos de polimerización.

Para la síntesis de polímeros mediante polimerización por radicales libres, existen cuatro técnicas que son comúnmente utilizadas. Cada una de estas técnicas tiene condiciones específicas y dan origen a polímeros con características diferentes. Cada uno de esos métodos tiene sus ventajas y sus inconvenientes.

Polimerización en masa.

La polimerización en masa es una técnica simple, homogénea, donde solo el monómero y el iniciador están presentes en el sistema. Se realiza añadiendo directamente el iniciador al monómero líquido. En el caso de que la polimerización sea iniciada térmicamente o por radiación, solo habrá monómero en el medio reaccionante. Por consiguiente, esta técnica es económica, además de producir polímeros con un alto grado de pureza, obteniéndose productos libres de contaminantes y de alta claridad óptica. Esta polimerización es altamente exotérmica, presentándose dificultades en el control de la temperatura y de la agitación del medio reaccionante, que rápidamente se vuelve viscoso desde el inicio de la polimerización, dificultándose la evacuación del calor desarrollado, por lo que se crean zonas calientes en las que puede tener lugar la autoaceleración.

Polimerización en solución.

En la polimerización en disolución, además del monómero y del iniciador, se emplea un disolvente, que debe disolverlos, formando un sistema homogéneo. El polímero formado puede ser soluble o no en el disolvente usado. En caso de que el polímero sea insoluble, es fácilmente separable del medio reaccionante por filtración. Si el polímero es soluble, se utiliza un reactivo para precipitarlo en forma de fibras o polvo. La presencia de un disolvente facilita la transmisión de calor y se reduce la viscosidad del medio, con lo que tiene como ventaja una temperatura homogénea debido a la fácil agitación del sistema, que evita el problema del

sobrecalentamiento. Sin embargo, se puede producir transferencia de cadena a las moléculas de este nuevo componente, que se traduce en una reducción del peso molecular.

Polimerización en suspensión.

Es una polimerización heterogénea donde el monómero y el iniciador son insolubles en el medio dispersante, en general el agua. En la polimerización en suspensión en fase acuosa mediante agitación se mantiene el monómero (insoluble en agua) en forma de gotas en las que tiene lugar la reacción. El iniciador está disuelto en el monómero. El monómero es la fase dispersa y da lugar a un polímero en fase sólida también disperso. La dispersión se mantiene por una combinación de agitación y el empleo de estabilizadores solubles en agua. La agitación del sistema es un factor muy importante en esta técnica, pues según la velocidad de agitación empleada, varía el tamaño de las partículas.

Polimerización en emulsión.

La polimerización en emulsión ([Figura 9](#)) es similar a la en suspensión, con la diferencia que, mediante un agente emulsionante, se logra que el diámetro de las gotas de la fase orgánica sea mucho menor; además, el iniciador debe ser soluble en la fase acuosa (persulfatos, agua oxigenada, sistemas redox, etc.). Como agentes emulsionantes se usan, además de los detergentes clásicos, otros surfactantes, como alcoholes sulfonados, aminas alifáticas, alcohol polivinílico, etc. Tiene una alta velocidad de reacción y conversión, siendo de fácil control de agitación y temperatura.

Los polímeros obtenidos con esta técnica presentan altos pesos moleculares, son más difíciles de purificar por la gran cantidad de aditivos adicionados. Sin embargo esta técnica tiene gran importancia industrial y es muy empleada en poliadiciones, principalmente cuando se aplica directamente el látex resultante. En esta polimerización, el iniciador es soluble en agua, mientras que el monómero es apenas parcialmente soluble. El agente emulsionante juega un papel importante en este tipo de polimerizaciones y tiene como objetivo formar micelas. Algunas micelas son activas, o sea, la reacción de polimerización se procesa dentro de ellas, mientras que otras son inactivas (gotas de monómeros), constituyendo apenas una fuente de monómero. A medida que la reacción ocurre, las micelas inactivas suplen a las activas con monómero, que crecen hasta formar gotas de polímero, originando posteriormente el polímero sólido.

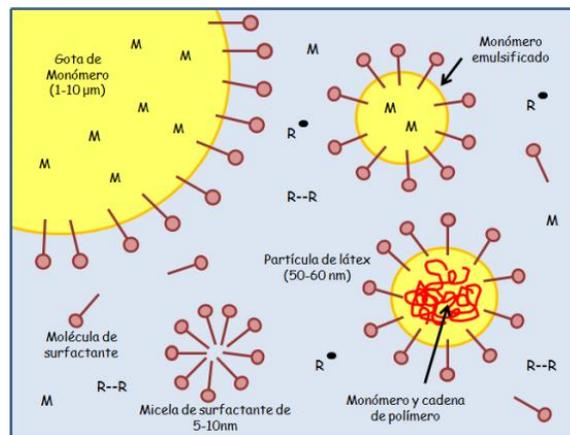


Figura 9. Sistema de polimerización en emulsión.

La mayor parte del monómero está en forma de gotas pero algo se introduce en las micelas y las hincha. El polímero se forma dentro de estas micelas hacia donde se dirigen los radicales libres generados en la fase acuosa. Las gotitas actúan como depósitos de monómero y van disminuyendo de tamaño, ya que hay una difusión del monómero hacia las micelas (Tabla 1).

PROCESO DE POLIMERIZACIÓN	TAMAÑO DE PARTICULA (MICRAS)	PESO MOLECULAR PROMEDIO (g/mol)
Suspensión	45 a 400	24,000 a 80,000
Masa	70 a 170	28,000 a 80,000
Emulsión	1 a 20	38,000 a 85,000

Tabla 1. Tamaños de las partículas y pesos moleculares obtenidos mediante los procesos de polimerización.

4.5 Copolímeros.

Son polímeros constituidos por dos o más unidades monoméricas repetitivas a lo largo de las cadenas que conforman su estructura; cuando se obtiene un copolímero, las propiedades de los monómeros que lo integran se combinan formando un nuevo material, las principales finalidades para la obtención de un copolímero son las siguientes:

- Modificar las propiedades térmicas.
- Incrementar la resistencia frente a agentes químicos.
- Desarrollar propiedades ópticas.
- Generar nuevas aplicaciones.

- Mejorar las propiedades mecánicas, tales como resistencia a la compresión, a la tensión y flexibilidad.
- Optimizar los procesos de polimerización elevando la calidad del material y disminuyendo los costos de producción.

Clasificación de los copolímeros:

Los copolímeros pueden ser divididos en cuatro categorías: Copolímeros de bloque, alterados, al azar y de injerto.

Copolímeros de bloque.

Las unidades monoméricas que constituyen al copolímero poseen un orden estructural específico en la cadena. El copolímero exhibe largas secuencias de un mismo monómero, agrupándose entre sí; el comportamiento estructural es similar a enlazar homopolímeros (Figura 10).

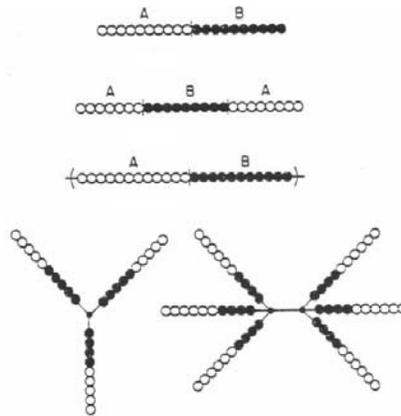


Figura 10. Copolímero en bloque.

Copolímeros alternados.

En este caso las unidades monoméricas siguen un orden específico en la cadena estructural, son obtenidos al controlar la alimentación de monómero en un proceso (Figura 8).



Figura 8. Copolímeros alternados.

Copolímeros al azar.

Están constituidos por unidades monoméricas sin orden estructural alguno en la cadena del copolímero, son obtenidos mediante cualquier proceso de polimerización (Figura 12).



Figura 12. Copolímeros al azar.

Copolímeros de injerto.

Los copolímeros de injerto son conocidos por su gran importancia en las ciencias aplicadas como polímeros de especialidad. En este caso, uno de los monómeros sirve como matriz o cadena macromolecular, mientras que el otro monómero va injertándose sobre la matriz. Estos copolímeros son obtenidos mediante polimerización por radicales libres, apertura de anillo, catiónica y aniónica. También existen copolímeros de injerto en los cuales los monómeros son entrecruzados formando una red tridimensional, en donde un monómero actúa como matriz polimérica sobre otro que va entrecruzando las cadenas (Figura 13). Estos copolímeros de injerto son obtenidos generando radicales libres en un polímero en presencia de un monómero utilizando como agente reticulante azufre, tetrasulfuro o algunos peróxidos. A este proceso de copolimerización también se le conoce como vulcanizado.

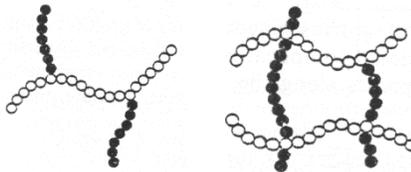


Figura 13. Copolímero de injerto

4.6 Biopolímeros.

Los biopolímeros son macromoléculas producidas por organismos vivos o un material que es utilizado para la fabricación de dispositivos encaminados a interactuar con los tejidos humanos que pueden ser usados por cualquier período de tiempo para tratar, aumentar o reemplazar tejidos, órganos o funciones del cuerpo; estos materiales pueden ser de fuentes naturales o sintéticas. Entre los polímeros de origen natural se encuentra la celulosa, el almidón, los péptidos, las proteínas, la quitina, el RNA y ADN, en los cuales las unidades monoméricas son aminoácidos, nucleótidos y azúcares.

- **Ácidos nucleicos:** Los ácidos nucleicos pueden ser considerados, tal vez, los biopolímeros más importantes ya que son los portadores de la información genética heredada entre generaciones (Figura 14).

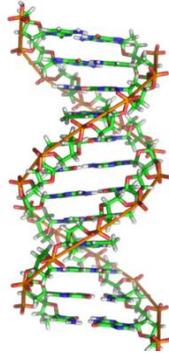


Figura 14. Estructura del ADN.

- **Proteínas:** Las proteínas, formadas por uniones peptídicas entre aminoácidos los cuales tienen distintas funciones biológicas. Entre estas se incluyen funciones estructurales (colágeno, queratina) (Figura 15) funciones catalíticas (enzimas) o inmunológicas (anticuerpos o inmunoglobulinas). Además presentan ventajas por su capacidad de formar redes, plasticidad y elasticidad, como componente para la fabricación de materiales.

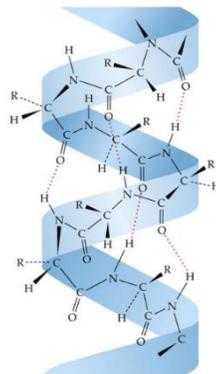


Figura 15. Estructura de la queratina.

- **Polisacáridos:** Son polímeros resultantes de la condensación acetálica de monosacáridos simples. Los polisacáridos suelen tener funciones estructurales (celulosa, quitina, pectinas, alginatos) pero también funciones de reserva energética en el reino vegetal (amilosa, amilopectina, inulina) (Figura 16) y en el reino animal (glucógeno).

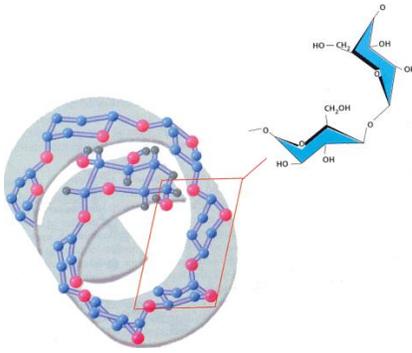


Figura 16. Estructura de la amilosa.

- **Politerpenos:** Los dos más conocidos son el poliisopreno (caucho natural o químicamente isómero cis-1,4-polisopreno) y la gutapercha (caucho de propiedades mecánicas inferiores, el isómero trans-1,4-polisopreno).

De los materiales biopoliméricos, generalmente de consistencia sólida pueden ser de materiales vivos o no vivos. Si el material es vivo se denomina “injerto” y los no vivos usados dentro del cuerpo se denominan “implantes”. Las llamadas prótesis pueden considerarse “endoprótesis” si se encuentran contenidas totalmente dentro del organismo y “exoprótesis” si están completamente afuera.

La biocompatibilidad se define como una respuesta apropiada del huésped con respecto al biopolímero, es decir, que el material no sea dañino dentro del cuerpo, pues se incluyen las interacciones locales de éste y del tejido circundante en ambas direcciones. Un material es no biocompatible si es tóxico y/o causa la muerte del tejido vecino. La biocompatibilidad puede considerarse “inerte” si no hay reacción alguna con el tejido (formación de una capa fibrosa alrededor del implante) y el material es estable por períodos indefinidos de tiempo; “bioactivo”, si existen interacciones específicas con el tejido circundante; “bioabsorbible” si se disuelve dentro del cuerpo a través de una actividad celular y el espacio vacante se ocupa eventualmente con tejido, y “biodegradable” si el material falla gradualmente debido a una actividad biológica específica.

Los materiales biopolímeros en su mayoría están destinados a reemplazar tejidos y órganos blandos, como el caso de corazones artificiales a base de poliuretano, lentes de contacto suaves a base de polihidroxietilmetacrilato (pHEMA) entrecurados con etilenglicol dimetilacrilado (EGDMA), articulaciones a base de dimetilsiloxano.

4.7 Proteínas y aminoácidos.

Las proteínas son biomoléculas formadas básicamente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Pueden además contener azufre y en algunos tipos de proteínas, fósforo, hierro, magnesio y cobre. Pueden considerarse polímeros ya que están formados por moléculas más pequeñas que reciben el nombre de aminoácidos y serían, por tanto, unidades de monómeros. Los aminoácidos están unidos mediante enlaces peptídicos. La unión de un bajo número de aminoácidos da lugar a un péptido; si el número de aminoácidos que forma la molécula no es mayor de 10, se denomina oligopéptido; si es superior a 10 se llama polipéptido y si el número es superior a 50 aminoácidos son proteína. Desde un punto de vista químico, existen dos grandes grupos de proteínas: Las proteínas simples, formadas exclusivamente por α -aminoácidos, y Las proteínas conjugadas, que contienen además una proporción significativa de otros componentes. La fracción no aminoacídica se llama grupo prostético, y puede ser un azúcar, un lípido, un ácido nucleico o una sustancia inorgánica.

Un aminoácido es una molécula orgánica que en su estructura contiene un grupo amino (NH_2) y un grupo carboxilo (COOH) los cuales se unen a un carbono ($-\text{C}-$). Las otras dos valencias de carbono α quedan saturadas con un átomo de hidrógeno ($-\text{H}$) y con un grupo químico variable al que se denomina radical ($-\text{R}$) (Figura 17). Los aminoácidos son los monómeros a partir de los cuales se forman las proteínas.

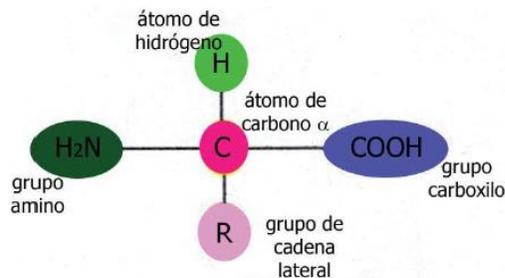


Figura 17. Fórmula general de un aminoácido.

Los aminoácidos experimentan una reacción ácido-base que los transforma en un ion dipolar o zwitterion (Figura 18), en el que la carga positiva se sitúa en el nitrógeno (formando un ion amonio) y la carga negativa en el oxígeno del anión carboxilato. Un concepto de vital importancia al considerar las propiedades eléctricas de los aminoácidos es el de punto isoeléctrico (pI); el cual puede ser definido como el valor de pH al cual un aminoácido tiene carga neta es cero.

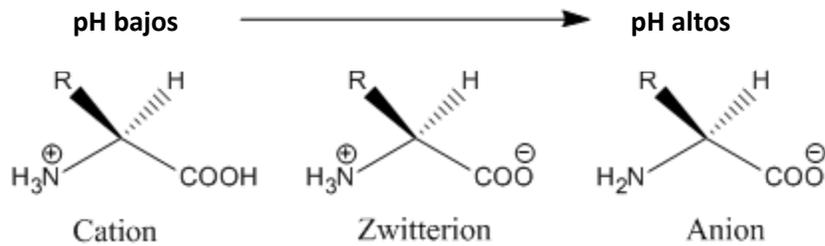


Figura 18. Representación de iones dipolares en aminoácidos.

El pI de un aminoácido coincide con la forma zwitterionica de este, por consiguiente puede afirmarse que un aminoácido tiene carga positiva a un pH por debajo de su pI y tiene carga negativa a un pH por encima de su pI debido a que por debajo del pI predomina la especie protonada (cargada positivamente) y por encima predomina la especie desprotonada (cargada negativamente) (figura 15). Todos los aminoácidos poseen una forma zwitterionica, sin embargo en el caso de los aminoácidos con un grupo R ionizable, el establecimiento de la forma zwitterionica se verá influenciado por las características de cada grupo $-R$ en particular.

Clasificación de los aminoácidos.

Existen 20 aminoácidos los cuales se encuentran en las proteínas y se puede distinguir por la substitución de los grupos $-R$ en el átomo del carbono α . Se clasifican en base a su obtención por el organismo y a las propiedades de sus grupos $-R$.

De acuerdo a la obtención por el organismo.

Se clasifican en esenciales y no esenciales. Se denominan esenciales a aquellos aminoácidos que no pueden ser sintetizados por el organismo de los seres humanos, por lo tanto deben ser incorporados a través de los alimentos; los aminoácidos restantes (no esenciales) pueden ser sintetizados por el organismo de los seres humanos. Los aminoácidos esenciales son diez, pero dos solo son realmente esenciales en determinadas condiciones como la lactancia, los periodos de crecimiento celular y la enfermedad (Arginina e Histidina) (Tabla 2).

Esenciales	No esenciales
Valina (Val, V)	Alanina (Ala, A)
Leucina (Leu, L)	Prolina (Pro, P)
Treonina (Thr, T)	Glicina (Gly, G)
Lisina (Lys, K)	Serina (Ser, S)
Triptófano (Trp, W)	Cisteína (Cys, C)
Histidina (His, H)	Asparagina (Asn, N)
Fenilalanina (Phe, F)	Glutamina (Gln, Q)
Arginina (Arg, R)	Aspartato (Asp, D)
Metionina (Met, M)	Glutamato (Glu, E)

Tabla 2. Clasificación de aminoácidos: Esenciales y no esenciales

De acuerdo a la naturaleza de los grupos radical (-R).

Los grupos -R son los responsables de las características particulares de cada aminoácido. Esta clasificación se fundamenta básicamente en la polaridad de los grupos -R y clasifica a los 20 aminoácidos en 5 grupos ([Figura 19](#)).

-Apolares o alifáticos: Se caracterizan por ser fuertemente hidrofóbicos y salvo algunas excepciones (glicina y prolina) confieren estabilidad a las estructuras proteicas mediante el establecimiento de interacciones hidrofóbicas, por tanto suelen ubicarse en el centro de las proteínas con estructura terciaria.

-Aromáticos: El grupo -R es un ciclo aromático, por consiguiente son relativamente hidrofóbicos. La Tirosina destaca en este grupo por poseer un grupo hidroxilo (-OH) que le permite formar puentes de hidrógeno y actuar como grupo funcional de varias enzimas.

-Polares sin carga: Son mucho más hidrofílicos que los anteriores y a pesar de no poseer carga neta, la presencia de grupos funcionales con carácter polar les permiten formar puentes de hidrógeno.

-Polares con carga positiva: Destaca la histidina debido a que es el único de los 20 aminoácidos que posee un grupo -R con un pKa próximo a la neutralidad, por lo que a pH puede estar cargada positivamente o no poseer carga neta.

-Polares con carga negativa: Es el grupo menos numeroso; formado por 2 aminoácidos.

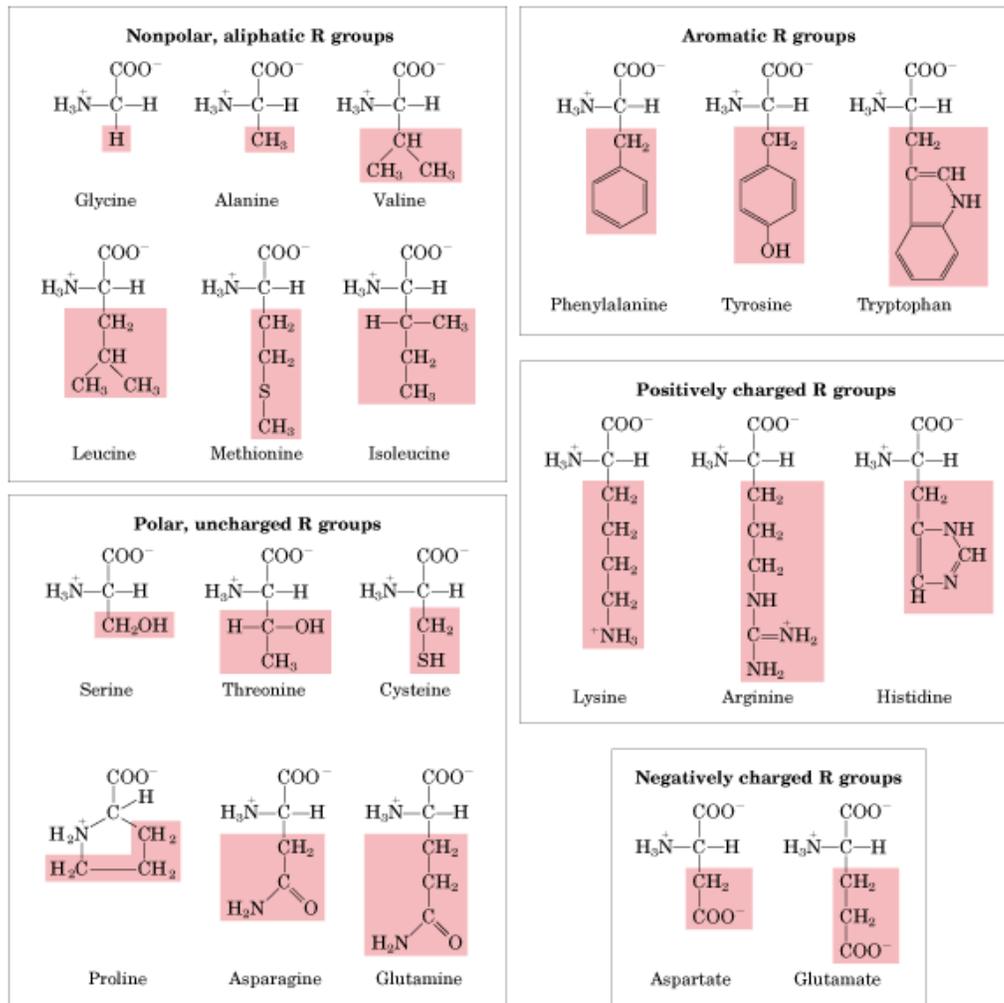


Figura 19. Clasificación de los aminoácidos según su grupo -R.

Enlace peptídico.

Los aminoácidos se encuentran unidos linealmente por medio de uniones peptídicas. Estas uniones se forman por la reacción de síntesis (vía deshidratación) entre el grupo carboxilo del primer aminoácido con el grupo amino del segundo aminoácido. La unión de unos pocos aminoácidos forma un oligopéptido, mientras que la unión de varios de ellos se denomina polipéptido. Usualmente suele utilizarse

los términos polipéptidos y proteínas de forma indistinta, sin embargo usualmente los llamados péptidos tienen masas moleculares inferiores a 10,000 y las denominadas proteínas tienen masas superiores.

Dos moléculas de aminoácido se unen mediante un enlace de tipo amida covalente CO-NH con la pérdida de una molécula de agua y el producto de esta unión es un dipéptido (Figura 20). El grupo carboxilo libre del dipéptido reacciona de modo similar con el grupo amino de un tercer aminoácido, y así sucesivamente hasta formar una larga cadena (polipéptido).

En su mayoría los péptidos presentan en uno de sus extremos un grupo amino sin reaccionar o grupo amino terminal (N-terminal) y un grupo carboxilo sin reaccionar en el otro extremo denominado carboxilo terminal (C-terminal). Por convención un péptido se escribe y se lee con el grupo N-terminal a la izquierda y el C-terminal a la derecha (Figura 21).

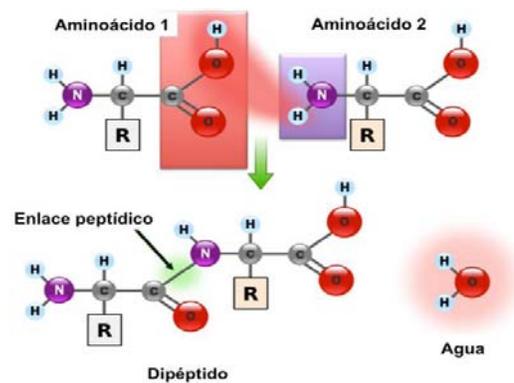


Figura 20. Formación del enlace peptídico.

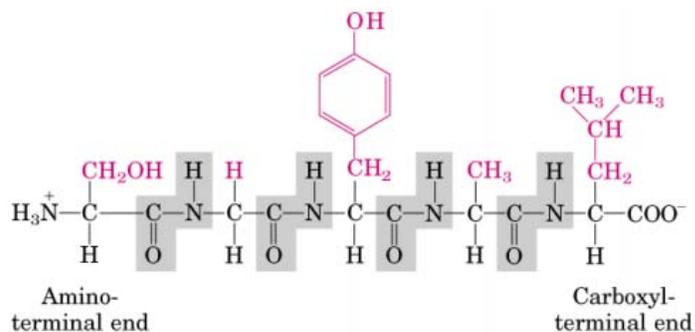


Figura 21. Grupo N-terminal y C-terminal.

Estructura de las proteínas.

Estructura primaria.

Corresponde a la secuencia lineal de aminoácidos de la cadena polipeptídica, que le confiere su identidad individual. La estructura primaria de una proteína es determinante en la función que cumplirá después, así las proteínas estructurales (como aquellas que forman los tendones y cartílagos) poseen mayor cantidad de aminoácidos rígidos y que establezcan enlaces químicos fuertes unos con otros para dar dureza a la estructura que forman. Generalmente, el número de aminoácidos que forman una proteína oscila entre 80 y 300. Los enlaces que participan en la estructura primaria de una proteína son covalentes: son los enlaces peptídicos.

Estructura secundaria.

Es el ordenamiento espacial estable de aminoácidos cercanos en la cadena polipeptídica, que resulta de interacciones por enlaces de hidrógeno entre los grupos C=O y N-H de los enlaces peptídicos. Se conocen dos tipos de estructura secundaria: Hélice alfa y hoja beta (la cadena proteica se extiende en forma de zigzag).

Hélice alfa: Esta estructura es periódica y en ella cada enlace peptídico puede establecer dos puentes de hidrógeno, un puente de hidrógeno se forma entre el grupo -N-H del enlace peptídico del aminoácido en posición n y el grupo -C=O del enlace peptídico del aminoácido situado en posición n-4.

Hoja beta: En esta estructura las cadenas laterales de los aminoácidos se sitúan de forma alternante a la derecha y a la izquierda del esqueleto de la cadena polipeptídica. Las estructuras β de distintas cadenas polipeptídicas o bien las estructuras β de distintas zonas de una misma cadena polipeptídica pueden interaccionar entre sí mediante puentes de hidrógeno, dando lugar a estructuras laminares llamadas por su forma hojas plegadas u hojas β .

Estructura terciaria.

Se refiere a la posición espacial que adopta la proteína que se enrolla sobre sí misma. Se distinguen dos tipos de estructura terciaria:

- Proteínas con estructura terciaria de tipo fibroso en las que una de las dimensiones es mucho mayor que las otras dos. Son ejemplos el colágeno, la queratina del

cabello o la fibroína de la seda, En este caso, los elementos de estructura secundaria (hélices alfa u hojas beta) pueden mantener su ordenamiento sin recurrir a grandes modificaciones, tan sólo introduciendo ligeras torsiones longitudinales.

- Proteínas con estructura terciaria de tipo globular, más frecuentes, en las que no existe una dimensión que predomine sobre las demás, y su forma es aproximadamente esférica. En este tipo de estructuras se suceden regiones con estructuras al azar, hélice alfa, hoja beta, acodamientos y estructuras supersecundarias.

Las fuerzas que estabilizan la estructura terciaria de una proteína pueden ser dos:

- Los enlaces covalentes pueden deberse a la formación de un puente disulfuro entre dos cadenas laterales de Cys, o a la formación del enlace amida (-CO-NH-) entre las cadenas laterales de la Lys y un aminoácido dicarboxílico (Glu o Asp).
- Los enlaces no covalentes pueden ser de cuatro tipos: Fuerzas electrostáticas entre cadenas laterales ionizadas con cargas opuestas, Puentes de hidrógeno, entre las cadenas laterales de aminoácidos polares, Interacciones hidrofóbicas entre cadenas laterales apolares y fuerzas de polaridad debidas a interacciones dipolo-dipolo.

Estructura cuaternaria

A diferencia de la estructura secundaria y terciaria, que resultan de la interacción internas de una cadena polipeptídica, cuando la proteína tiene más de una cadena también existen interacciones entre ellas. El arreglo espacial de las diferentes cadenas polipeptídicas de las proteínas que se mantienen unidas por interacciones débiles, formándose un complejo proteínico, se denomina estructura cuaternaria.

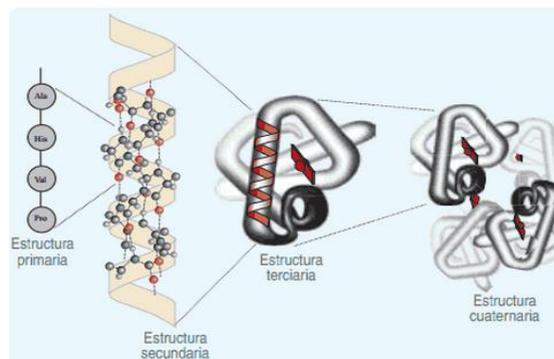


Figura 22. Estructura de una proteína.

Propiedades de las proteínas.

En disolución acuosa, los residuos hidrofóbicos de las proteínas se acumulan en el interior de la estructura, mientras que en la superficie aparecen diversos grupos con carga eléctrica, en función del pH del medio. En torno a los grupos cargados, los dipolos del agua se orientan conforme a la carga eléctrica de cada grupo, de tal manera que la proteína presenta una capa de solvatación formada por el agua de hidratación, que es el agua retenida por las cargas eléctricas de la superficie de las proteínas. Los aminoácidos polares sin carga también se disponen en la superficie, donde interaccionan con el agua mediante puentes de hidrógeno. Cualquier factor que modifique la interacción de la proteína con el disolvente disminuirá su estabilidad en disolución y provocará la precipitación. La precipitación suele ser consecuencia del fenómeno llamado desnaturalización. Se llama desnaturalización de las proteínas a la pérdida de las estructuras de orden superior (secundaria, terciaria y cuaternaria), quedando la cadena polipeptídica reducida a un polímero estadístico sin ninguna estructura tridimensional fija. La desnaturalización provoca diversos efectos en la proteína: Una drástica disminución de su solubilidad, ya que los residuos hidrofóbicos del interior aparecen en la superficie; cambios en las propiedades hidrodinámicas de la proteína, aumentando la viscosidad y disminuyendo el coeficiente de difusión y por último pérdida de las propiedades biológicas. Los agentes que provocan la desnaturalización de una proteína se llaman agentes desnaturalizantes. Se distinguen agentes físicos (calor) y químicos (detergentes, disolventes orgánicos, pH, fuerza iónica).

4.8 Colágeno.

El colágeno es la principal proteína constituyente de las capas intercelulares o tejidos conjuntivos fibrosos, los cuales son los mayores elementos estructurales en la anatomía de los vertebrados (piel, tendones, huesos). Es la proteína más abundante del organismo. Se caracteriza principalmente por su notable resistencia: una fibra de 1 mm de diámetro puede soportar una carga de 10 a 40 kg.

La base molecular del colágeno está constituida por cadenas de polipéptidos y cada uno de éstos es un polímero de aminoácidos. La unidad esencial del colágeno está constituida por tres cadenas de polipéptidos que se encuentran entrecruzadas formando una triple hélice, constituyendo una unidad macromolecular denominada tropocolágeno. Las macromoléculas de tropocolágeno se agrupan entre sí constituyendo estructuras llamadas fibrillas de colágeno. Cada fibrilla de colágeno está constituida por miles de moléculas de tropocolágeno, que son visibles al microscopio electrónico. Si bien en algunas partes están aisladas, más o menos sueltas, en la mayor parte del organismo, sobre

todo en la dermis, centenares de estas fibrillas se unen lado a lado formando fibras colágenas mucho más voluminosas (Figura 23).

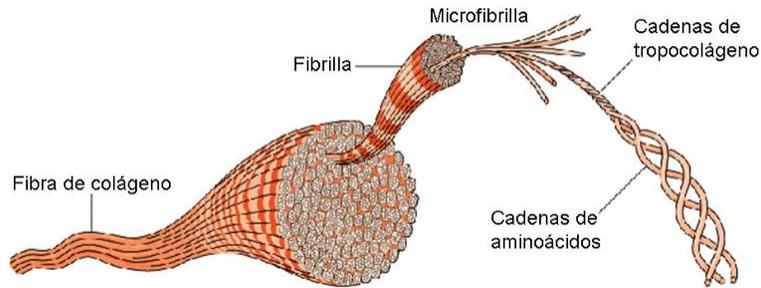


Figura 23. Constitución de las fibras de colágeno.

El colágeno está especialmente concentrado en aquellos tejidos que soportan peso (el peso del organismo), fundamentalmente los cartílagos y los huesos. También existe colágeno concentrado en altas proporciones en aquellas partes del organismo que transmiten fuerza, como los tendones (ligamentos que unen los músculos con las piezas esqueléticas). Además aparece en cantidades numerosas en aquellos lugares como la dermis o las fascias (láminas que recubren los músculos) sirven para proteger, o donde se necesita un material que resista la tracción o los cambios de volumen. Finalmente, el colágeno, en una de sus formas, constituye prácticamente una armazón de microfibrillas, que sostiene la estructura de todos los órganos y vísceras del organismo. El peso molecular del tropológeno ha sido estimado entre 300,000 y 325,000. Cada molécula de tropológeno está constituida por tres cadenas de polipéptidos en cada una de las cuales hay alrededor de 1000 aminoácidos. La estructura de la triple hélice del tropológeno es fundamental y es característica de esta proteína fibrilar (Figura 24). Cuando se analiza la composición química de estas cadenas de polipéptidos que constituyen al colágeno, se ve que los aminoácidos que conforman el colágeno tienen una distribución bastante regular que caracteriza a las proteínas, ya que se encuentra una estructura repetitiva en la secuencia de aminoácidos.

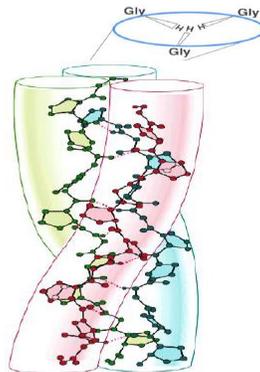


Figura 24. Triple hélice del colágeno.

Composición del colágeno:

El colágeno está constituido por un conjunto de tres cadenas polipeptídicas, agrupadas en una estructura helicoidal (Figura 25) cada polipéptido está formado por tres aminoácidos fundamentalmente: Glicina, prolina y lisina.

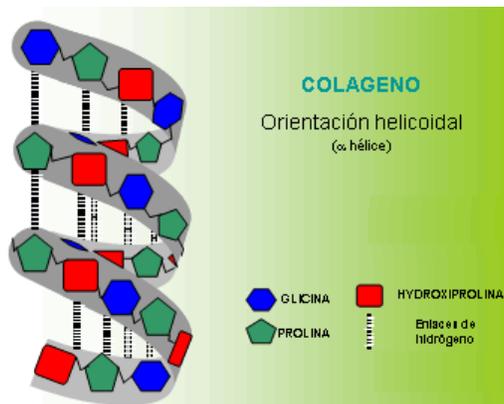


Figura 25. Estructura hélice del colágeno

Glicina.

Constituye la tercera parte de los aminoácidos de cada cadena. Es el único aminoácido con un grupo -R (átomo de hidrogeno) lo suficientemente pequeño para el espacio disponible, por esto la cadena lateral se dispone hacia el interior permitiendo que las tres cadenas polipeptídicas formen una triple hélice compacta (Figura 26).

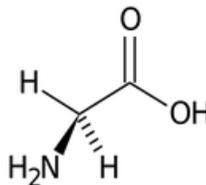


Figura 26. Estructura de la glicina.

Prolina.

La hélice del colágeno es rica en prolina, parte de esta prolina se transforma posteriormente en 4-hidroxiprolina (HYP) (Figura 27) exclusiva del colágeno, mediante la introducción de un grupo hidroxilo en el carbono 4, con lo que adquiere la capacidad de formar enlaces de hidrógeno. Entre Pro y HYP forman el 20-30% del colágeno.

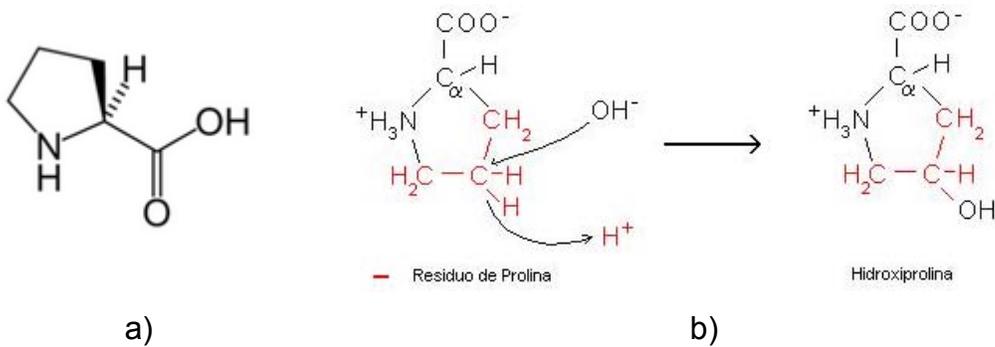


Figura 27. a) Estructura de la prolina, b) formación del 4-hidroxi prolina.

Lisina.

Parte de la cual se transforma posteriormente en 5-hidroxislisina (HYL) (Figura 28) mediante la introducción de un grupo hidroxilo en el carbono 5. A través de este grupo hidroxilo se unen glúcidos transformando al colágeno en una glucoproteína.

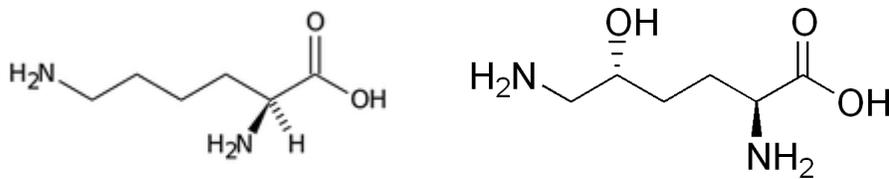


Figura 28. a) Estructura de la lisina y b) 5-hidroxislisina.

Tipos de colágeno.

Se conocen más de 20 tipos de colágeno, estos tipos se diferencian según como se encuentre la secuencia de los aminoácidos, por los intereses de este trabajo se exponen el colágeno I y II.

Colágeno tipo I.

Se caracteriza porque la molécula de tropocolágeno en este caso está constituida por dos cadenas que se denominan alfa 1 (I), o sea, dos cadenas alfa 1 idénticas y una segunda cadena que se denomina alfa 2, que tiene una secuencia de aminoácidos distinta. Este es un colágeno fabricado fundamentalmente por los fibroblastos. Predomina en el hueso, en los cartílagos y en la dermis, o sea, que la mayor parte de colágeno de la dermis, que es lo que nos interesa a nosotros, pertenece a este tipo I de colágeno.

Son las fibras más gruesas de todas, fuertemente birrefringentes al microscopio de polarización y se tiñen selectivamente con un colorante específico del que se ha empleado en los últimos tiempos, que se denomina picosirius. Este colorante permite distinguir el colágeno I del II del III y también del IV y el V. En este caso las fibras aparecen de un color amarillo rojizo. Estas fibras tienen el bandeo transversal, sea la periodicidad transversal bien desarrollada, bien característica y constituye el colágeno más importante desde el punto de vista estructural.

Colágeno tipo II

Aparece en el cartílago y otras estructuras, como por ejemplo el líquido que rellena el globo ocular llamado humor vítreo. Son fibras, por el contrario, muy finas, que no se ven o se ven con dificultad en el microscopio óptico, pero sí se ven con el microscopio electrónico. Son fibras que no presentan este bandeo característico que presenta las fibrillas del tipo I y están constituidas por tres cadenas denominadas alfa 1 (II). Son tres cadenas iguales, entrelazadas, donde lo característico es que hay más, hidroxilisina y lisina que en el colágeno ordinario de tipo I.

4.9 Cartílago.

El cartílago es una forma especializada de tejido conjuntivo constituida por elementos celulares llamados condrocitos distribuidos de forma dispersa en una matriz extracelular dura y de tipo gel. Este tejido no está atravesado por vasos ni nervios, y sus células, que se alojan en pequeñas cavidades o lagunas, se nutren mediante difusión a través de la fase acuosa de la matriz y a partir de los capilares de los tejidos que rodean al cartílago. Las propiedades de viscosidad y elasticidad de su matriz extracelular le dan al cartílago una dureza y flexibilidad poco habituales. El cartílago puede crecer rápidamente manteniendo al mismo tiempo un grado considerable de rigidez, una propiedad que le convierte en un material especialmente favorable para el desarrollo del embrión. La mayor parte de los esqueletos axial y de las extremidades se forman primero en cartílago que más tarde es sustituido por hueso.

Se distinguen tres tipos de cartílago, hialino, elástico y fibrocartílago, según la cantidad de matriz extracelular y la abundancia relativa de fibras de colágeno y elastina que existen en la misma (**Figura 29**). El cartílago hialino es la forma más abundante y característica, mientras que los otros dos tipos de cartílago se pueden considerar variantes de esta estructura básica.

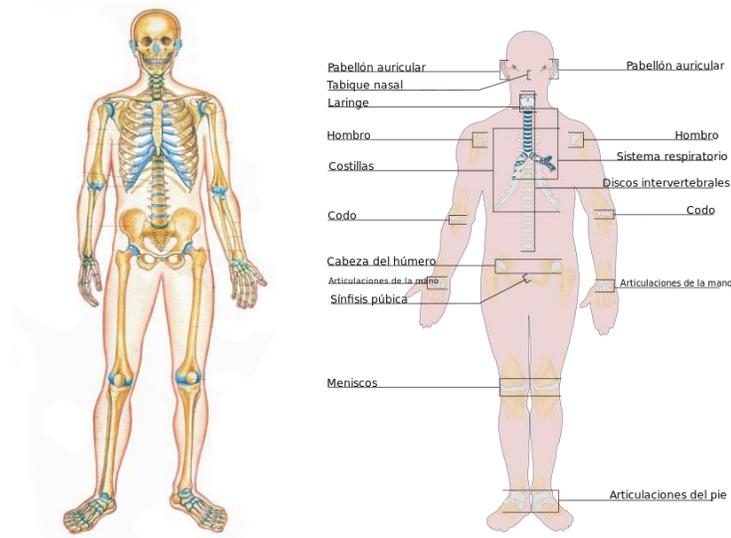


Figura 29. El cartílago en el cuerpo humano.

Cartílago hialino

En el adulto, el cartílago hialino está presente en los anillos traqueales, la nariz (Figura 30) y la laringe, las superficies articulares y los extremos anteriores de las costillas que se unen al esternón. Es un tejido parcialmente translúcido que tiene una coloración azul grisácea. Su estructura microscópica se puede conocer mejor al estudiar el desarrollo del embrión.

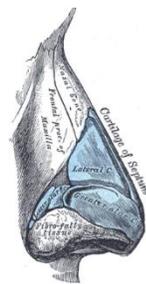


Figura 30. Cartílago hialino presente en la nariz.

En el tejido fresco, la matriz del cartílago hialino presenta un color opalino azul grisáceo y es parcialmente translúcida. El colágeno predominante en la matriz cartilaginosa es el de tipo II. Al contrario de las fibras de tipo I de otros tejidos conjuntivos cuyo diámetro promedio es de 75nm, el colágeno de tipo II forma fibras débiles con estriación transversal cuyo diámetro es de 15 a 45nm y que no forman haces gruesos. Las fibras de menor tamaño constituyen una trama tridimensional laxa en toda la matriz. En la matriz interterritorial existe un gradiente de incremento del diámetro de las fibras desde las lagunas hacia la parte interna de la misma. El diámetro de las fibras también aumenta desde la superficie hasta el interior en el cartílago articular.

La organización molecular de la matriz cartilaginosa está idealmente adaptada para su función en las superficies articulares de los huesos largos que soportan peso. El entramado fibrilar del colágeno mantiene la configuración del tejido y resiste las fuerzas de tensión, al tiempo que los agregados de proteoglucanos que ocupan sus intersticios proporcionan un gel hidratado y firme que absorbe las fuerzas de compresión. Las células del cartílago vivo se adaptan a la forma de las lagunas en las que están alojadas, pero en los cortes histológicos suelen presentar una forma estrellada debido a que se encogen y retraen separándose de la pared de la laguna. Este retraimiento de las células es un artefacto del procesamiento de la muestra y tiene menor intensidad en las muestras que se procesan para estudio ultraestructural, aunque tampoco en este caso la calidad de conservación de las células es la ideal. El citoplasma suele presentar baja densidad, y contiene algunas pequeñas gotas de lípido y cantidades variables de glucógeno. El complejo de Golgi yuxtannuclear está vacuolado, y las cisternas del retículo endoplásmico suelen aparecer distendidas. Las mitocondrias pueden estar distorsionadas y presentan una matriz de baja densidad electrónica. Es evidente que la ultraestructura de los condrocitos se conserva pero con los métodos rutinarios de procesamiento de las muestras que la de otros tipos celulares.

Cartílago elástico y fibrocartílago.

El cartílago elástico está presente en el oído externo (**Figura 31**), las paredes del conducto auditivo externo y la trompa. Los condrocitos que lo forman son similares a los del cartílago hialino. El fibrocartílago tiene una gran similitud con el tejido conjuntivo convencional, y ambos se continúan sin que exista una línea clara de separación entre los mismos. Así, el fibrocartílago está presente en las zonas de inserción de ligamentos y tendones en el hueso. La mayor parte del fibrocartílago del cuerpo se encuentra en los discos intervertebrales, que constituyen en longitud aproximadamente la quinta parte de la columna vertebral (**Figura 30**) Por su parte, las vértebras muestran una fina capa de cartílago hialino en sus superficies superior e inferior.



Figura 30. Cartílago auricular y cartílago vertebral.

5 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

5.1 Electroforesis en gel (SDS-PAGE)

La electroforesis es una técnica que permite separar especies químicas (ácidos nucleicos o proteínas) a lo largo de un campo eléctrico en función de su tamaño y de su carga eléctrica. Los ácidos nucleicos, ADN y ARN, tienen por naturaleza carga negativa. Si ponemos fragmentos del ADN extraído de una muestra biológica sobre un soporte poroso (gel) y aplicamos un campo eléctrico, se producirá la migración diferencial de los fragmentos a través de los poros de la matriz. La tinción del gel permite observar el resultado de esta migración. El tamaño de los fragmentos de ADN se puede estimar comparándolos con el patrón de bandas que se obtiene de marcadores comerciales de peso molecular conocido. Así por ejemplo se puede usar para comparar muestras de individuo sano frente a individuo enfermo, para la identificación de ácidos nucleicos de agentes infecciosos o para la obtención de un fragmento determinado de ADN que, una vez localizado en el gel, puede ser extraído para análisis posteriores. El método que se sigue generalmente es el desarrollado por Laemmli en 1970. Los geles de poliacrilamida (PA) constituyen un excelente medio de soporte para las separaciones electroforéticas debido a su transparencia, elasticidad, porosidad y compatibilidad con una variedad de compuestos químicos. La poliacrilamida se forma por la copolimerización de la acrilamida y la bisacrilamida, reacción iniciada por la tetrametil etilendiamina (TEMED) y el persulfato de amonio. Entre las diversas técnicas de electroforesis en gel, se encuentra la SDS-PAGE que traduciendo sus siglas de español a inglés se denomina como electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio. En esta técnica se mezclan los compuestos químicos con el detergente aniónico SDS para formar complejos desnaturalizados cargados negativamente, dado que la relación carga/masa de las proteínas queda constante, estas pueden ser separadas por medio de una corriente eléctrica generando la movilidad dentro del gel y así mismo puede ser calculado el peso molecular proteínas en base a la migración presentando midiendo la distancia en el gel y graficando los resultados.

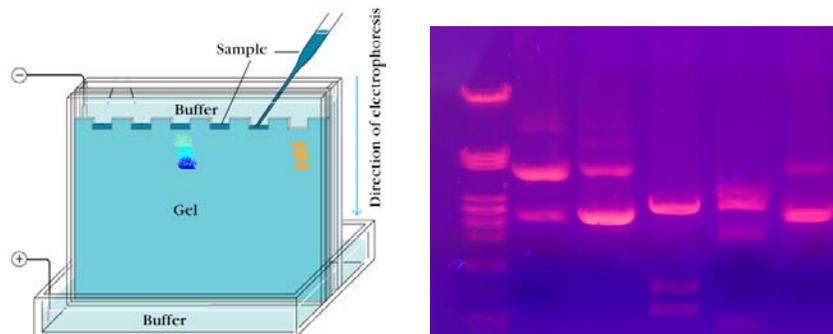


Figura 31. Electroforesis en gel, migración de las proteínas en el gel.

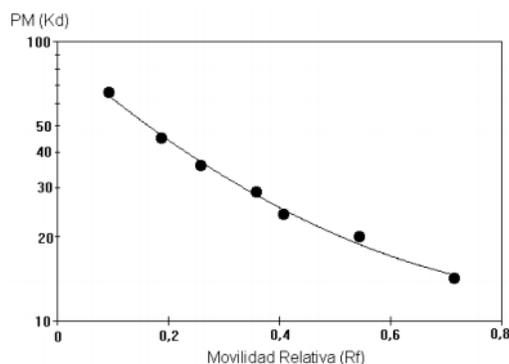


Figura 32. Curva de estimación de peso molecular.

Marcador	PM	Distancia (mm)	R _f (vs.70 mm)
Albúmina bovina	66.000	6,5	0,092
Ovalbúmina	45.000	13,0	0,186
Gliceraldeh-3-P-DH	36.000	18,0	0,257
Anhidrasa carbónica	29.000	25,0	0,357
Tripsinógeno	24.000	28,5	0,407
Inhibidor de tripsina	20.100	38,0	0,543
α-Lactalbúmina	14.200	50,0	0,714
Banda incógnita	?	44,0	0,623

Tabla 3. Ejemplo del peso molecular de una banda incógnita.

5.2 Espectroscopia Infrarroja (FTIR).

La espectroscopia infrarroja es una de las técnicas analíticas más utilizadas para la caracterización de materiales, específicamente su estructura a nivel molecular, debido a su facilidad y simplicidad. Se basa en el principio de la absorción o emisión de energía radiante que ocurre por la interacción de radiación electromagnética en el rango infrarrojo con los átomos y moléculas de un material; la radiación infrarroja es capaz de promover una transición entre diferentes estados vibracionales de las moléculas de acuerdo a la energía o frecuencia de la onda electromagnética, los cuales están asociados con la vibración de los enlaces presentes.

La región del infrarrojo abarca una amplia región del espectro electromagnético correspondiente a la radiación con números de onda entre 12800 y 10 cm^{-1} , razón por la cual por términos prácticos se divide en tres regiones: el infrarrojo cercano de 12800 a 4000 cm^{-1} (NIR), el infrarrojo medio de 4000 a 650 cm^{-1} (MIR) y el infrarrojo lejano de 650 a 10 cm^{-1} (FIR) (Figura 33).

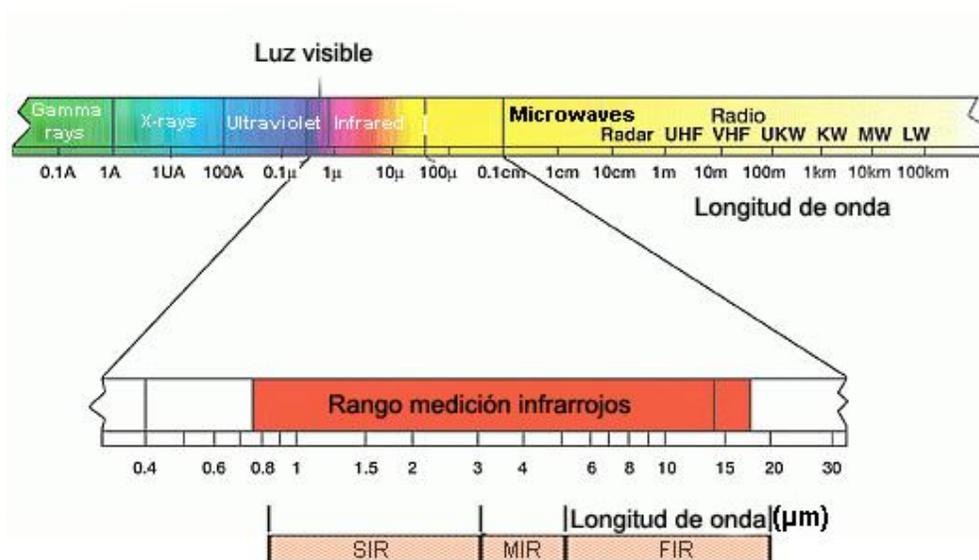


Figura 33. Región infrarroja del espectro electromagnético.

Las ventajas más relevantes de esta espectroscopia dentro de la caracterización de materiales son las siguientes:

1. Si dos moléculas están constituidas por átomos distintos, o tienen distinta distribución isotópica, o configuración, o se encuentran en ambientes químicos distintos y por tanto sus espectros infrarrojos serán distintos.
2. Una sustancia definida puede identificarse por su espectro infrarrojo. Estos espectros pueden ser considerados como las huellas digitales de dicha sustancia.
3. Los espectros muestran bandas que son típicas de grupos funcionales particulares y que tienen localizaciones e intensidades específicas dentro de los espectros infrarrojos.
4. A partir de los espectros se pueden inferir las estructuras moleculares. Para ello se requiere un modelo en el cual basar los cálculos.
5. Las intensidades en las bandas del espectro de una mezcla, son generalmente proporcionales a las concentraciones de las componentes individuales. Por lo tanto, es posible determinar la concentración de una sustancia y realizar análisis de muestras con varias componentes.
6. Es posible, mediante el uso de dispositivos experimentales adecuados, obtener espectros infrarrojos sin alteración de la muestra, lo que la convierte en una técnica no destructiva.
7. El tiempo necesario para obtener y almacenar un espectro infrarrojo es del orden de minutos.

Como se ha dicho este método se basa en el hecho de que las moléculas tienen niveles de energía discretos en los cuales vibran o rotan respecto a sus enlaces, mismos que son uniones de tipo electrostático semejantes a uniones elásticas y, en consecuencia, sus movimientos son periódicos o cuasiperiódicos. Todos los movimientos relativos de los átomos en una molécula son en realidad la superposición de los llamados modos normales de vibración, en los cuales todos los átomos se encuentran vibrando con la misma fase y frecuencia normal. El número de modos normales de vibración define el espectro vibracional de cada molécula. Estos espectros también dependen de las masas de los átomos involucrados, su arreglo geométrico dentro de la molécula, y la “elasticidad” de los enlaces químicos. Para una molécula formada por N átomos, el número de modos normales de vibración está dado por $3N-5$ si la molécula tiene geometría lineal y $3N-6$ si no es así.

Las moléculas diatómicas simples tienen solamente un enlace, el cual se puede estirar. Moléculas más complejas pueden tener muchos enlaces, y las vibraciones pueden ser conjugadas, llevando a absorciones en el infrarrojo a frecuencias características que pueden relacionarse a grupos funcionales específicos, dichas vibraciones ocurren generalmente por estiramiento (tensión) del enlace o por deformación (flexión) de éste. Las vibraciones por tensión son aquellas en las que los átomos oscilan alargando o acortando la distancia de enlace entre ellos sin modificar el ángulo enlace, y pueden ser de dos tipos: estiramiento simétrico (hay alargamiento o acortamiento de la longitud de ambos enlaces de manera sincronizada) (Figura 34) y estiramiento asimétrico (un enlace se alarga mientras el otro se acorta).

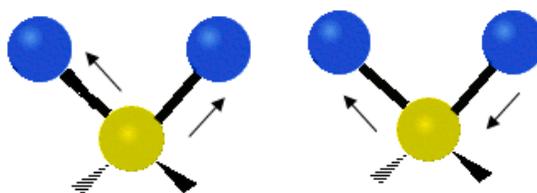


Figura 34. Modos de vibración de tensión: estiramiento simétrico y asimétrico

Las vibraciones por flexión son aquellas que modifican el ángulo de enlace y pueden presentarse dentro y fuera del plano de la molécula; y se dividen en asimétricas y simétricas. Las vibraciones de flexión simétricas y asimétricas en el plano son: scissoring o "tijera" y rocking (ρ), respectivamente, y las flexiones simétricas y asimétricas fuera del plano son: wagging o aleteo (w) y twisting o torsión (\square), respectivamente (Figura 35).

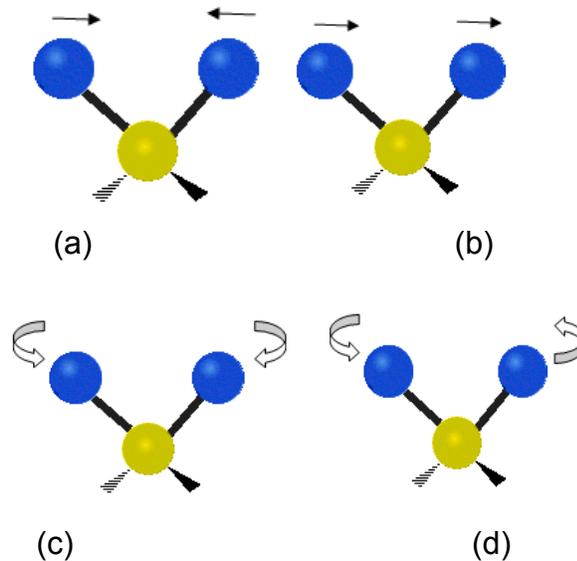


Figura 35. Modos de vibración de flexión: (a) tijera, (b) rocking, (c) wagging, (d) twisting.

La interacción de la radiación infrarroja con los estados vibracionales de una molécula sólo es posible si durante la vibración hay un cambio en el momento dipolar neto de la molécula.

Análisis Térmico.

Los métodos de análisis térmico se refieren a un grupo de técnicas en las que se estudia alguna propiedad fisicoquímica de un material mientras es sometido a un proceso de calentamiento controlado. Se distingue una docena de ellos que difieren en la propiedad estudiada y en el proceso de calentamiento. En el campo de los polímeros las técnicas más utilizadas son el Análisis Termogravimétrico (TGA) y la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

5.3 Análisis Termogravimétrico (TGA).

El método termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés, Thermogravimetric Analysis) permite medir el cambio en la masa de un material mientras es sometido a un proceso de calentamiento a temperatura controlada (isotérmico o en rampas) y bajo atmósfera controlada. La pérdida de masa que sufre la muestra durante el calentamiento se puede asociar a la presencia de agua, así como a la ruptura de enlaces, hasta la descomposición de la misma. La información obtenida por esta técnica se presenta en un termograma (Figura 36).

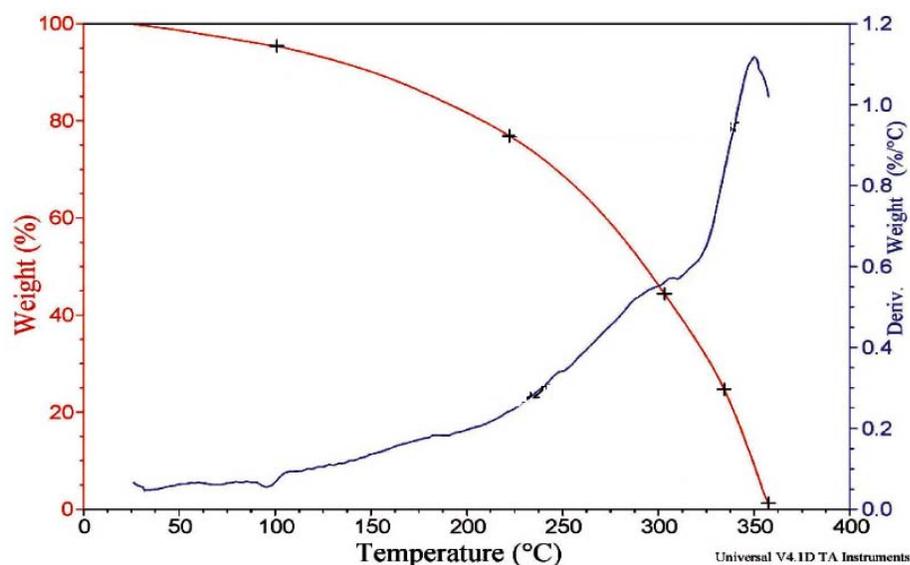


Figura 36. Termograma convencional (línea roja) y diferencial (línea azul).

Una de las variantes más utilizadas es el método dinámico que resulta útil cuando se estudia el comportamiento de la muestra mientras es sometida a un programa de temperaturas con una determinada velocidad de calentamiento. Si, por el contrario, se mantiene fija la temperatura y se estudia la variación de la masa con el tiempo, se hablará del método isoterma. En cualquier caso, siempre es posible reflejar el cambio de masa de la muestra como una serie temporal, ya que, aún en el caso dinámico, se conoce la evolución de la temperatura con el tiempo.

La curva que representa la velocidad de variación de masa, es la derivada de la curva termogravimétrica y se denomina DTG (Derivada termogravimétrica). Es también de gran interés, ya que permite determinar puntos críticos, como son los instantes de velocidad máxima de pérdida de masa. Las aplicaciones más típicas de esta técnica incluyen la determinación cualitativa de componentes que se volatilizan a cierta temperatura, tales como la humedad, así como la estabilidad térmica de materiales.

5.4 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

La calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés, Differential Scanning Calorimetry) permite el estudio de los procesos que involucran una variación de la entalpía del material, tales como los cambios de fase o de la estructura del material, pureza de materiales, entalpías de reacción y otras transiciones de primer y segundo orden.

Los equipos para DSC pueden trabajar en un intervalo de temperatura que va desde la temperatura del nitrógeno líquido hasta unos 600 °C, lo que la hace una técnica muy útil para caracterizar materiales que sufren transiciones térmicas en dicho intervalo de temperaturas, siendo los polímeros ejemplos característicos de estos materiales.

A través de este método se pueden determinar transiciones térmicas como la temperatura de transición vítrea (T_g), temperatura de fusión (T_m), temperatura de cristalización (T_c) (Figura 37).y se pueden hacer estudios de compatibilidad de polímeros, reacciones de polimerización y procesos de curado. Cualquier reacción polimérica que es acompañada por un cambio en la entalpía, puede ser seguida por esta técnica, pudiendo ser estudiada la cinética de la misma, debido a que las polimerizaciones son reacciones acompañadas de desprendimiento de calor.

En los polímeros amorfos, la T_g es la única transición importante y aparece como un cambio abrupto de la línea base, mientras que en aquellos altamente cristalinos, la T_g es difícil de observar debido a la baja proporción de fase amorfa en el polímero. La información de los procesos de fusión/cristalización se obtiene de manera cualitativa (posición del pico correspondiente a la temperatura de fusión/cristalización) y cuantitativa (área de pico correspondiente a la cristalinidad del polímero). La fusión se manifiesta en un pico endotérmico con subida más o menos gradual y regular. Si la línea base se mantiene tras la fusión, puede decirse que el material es estable para ser procesado por fusión, en caso contrario, es indicio de descomposición y debe estudiarse con más detalle por análisis termogravimétrico.

La finalidad de la calorimetría diferencial de barrido es registrar la diferencia en el cambio de entalpía que tiene lugar entre la muestra y un material inerte de referencia en función de la temperatura o del tiempo, cuando ambos están sometidos a un programa con control de temperatura. La muestra y la referencia se alojan en dos portamuestras idénticos que se calientan mediante resistencias independientes, esto hace posible emplear el principio de “balance nulo” de temperatura. Cuando en la muestra se produce una transición térmica (un cambio físico o químico que da lugar a una liberación o absorción de calor), se adiciona energía térmica, ya sea a la muestra o a la referencia, con objeto de mantener ambas a la misma temperatura. Debido a que la energía térmica es exactamente equivalente en magnitud a la energía absorbida o liberada en la transición, el balance de energía proporciona una medición calorimétrica directa de la energía de la transición.

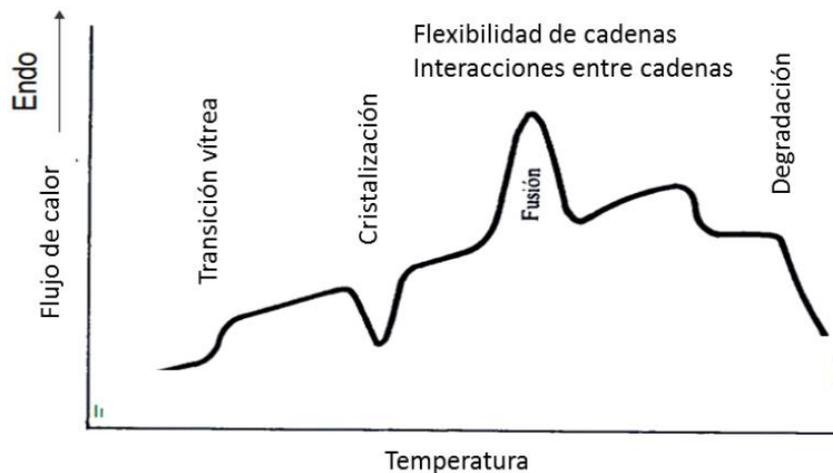


Figura 37. Transiciones presentes en un análisis de calorimetría diferencial de barrido.

5.5 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

La microscopía electrónica de barrido es una técnica que permite la caracterización morfológica y topológica de los materiales. En ella se utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen de alta resolución del material. La preparación de las muestras es relativamente fácil siendo únicamente necesario que éstas sean conductoras, lo cual se consigue mediante recubrimiento con una capa de carbono o una capa delgada de un metal como el oro. La imagen se forma mediante barrido de la muestra con electrones acelerados que viajan a través del cañón. Un detector mide la cantidad de electrones enviados que arroja la intensidad de la zona de muestra. En el microscopio electrónico de barrido (Figura 38).se aceleran los electrones en un campo eléctrico, para aprovechar su comportamiento ondulatorio, ello se consigue en la columna del microscopio, donde se aceleran mediante una diferencia de potencial de 1 a 30 KV. Los electrones acelerados por un voltaje pequeño se utilizan para muestras muy sensibles, como podrían ser las muestras biológicas sin preparación adicional o muestras muy aislantes. Los voltajes elevados se utilizan para muestras metálicas, ya que éstas en general no sufren daños por el haz de electrones y de esta manera se aprovecha la menor longitud de onda para tener una mejor resolución. Los electrones acelerados salen del cañón, y se enfocan mediante las lentes condensadoras y objetiva, cuya función es reducir el grosor del haz de electrones, de manera que incida en la muestra un haz de electrones lo más pequeño posible (para así tener una mejor resolución). Con las bobinas deflectoras se barre este fino haz de electrones sobre la muestra, punto por punto y línea por línea. Dichas lentes son en realidad electroimanes que son capaces de modificar la trayectoria del haz de electrones.

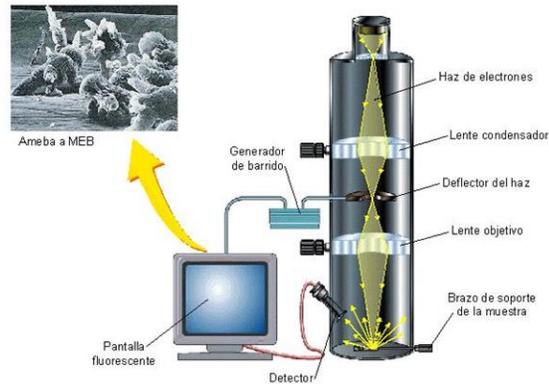


Figura 38. Microscopio electrónico de barrido.

La incidencia del haz de electrones con la muestra genera diversas interacciones con los electrones del material; en principio puede ocurrir que los electrones tengan choques elásticos con los del material dando origen a los llamados electrones retrodispersos. Otra posibilidad es que los electrones del haz generen desprendimiento de los electrones del material originando los electrones secundarios, electrones Auger y rayos X, los cuales son detectados en diferentes dispositivos, produciendo así la imagen.

5.6 Pruebas mecánicas.

Para la mayoría de los materiales es de gran importancia la caracterización de sus propiedades mecánicas puesto que de ello dependerá su aplicación. Estas técnicas son fundamentalmente importantes en el desarrollo de biomateriales destinados a funcionar como implantes o sustitutos de alguna parte del cuerpo, puesto que se debe garantizar que el material cumpla con las condiciones que resiste el órgano original. El estudio de las propiedades mecánicas se refiere a la respuesta de un sólido cuando es sometido a una fuerza externa, generándose regiones de esfuerzos de tipo tensorial, de flexión o de compresión que conducen a la deformación del mismo. De ahí que existan ensayos de tensión, compresión, flexión, dureza, fluencia, impacto, tenacidad a la fractura y fatiga, por mencionar los más característicos; siendo los más empleados el de tensión y el de compresión. El ensayo de compresión (**Figura 39**). mide la resistencia de una material a la aplicación gradual de una fuerza de compresión, el cual experimenta una deformación dependiente del esfuerzo aplicado. La prueba se efectúa sobre probetas estandarizadas las cuales son ensayadas en máquinas calibradas para aplicar los esfuerzos y deformaciones deseados. Para un material dado, los resultados de un único ensayo son aplicables a todo tamaño y forma de las muestras.

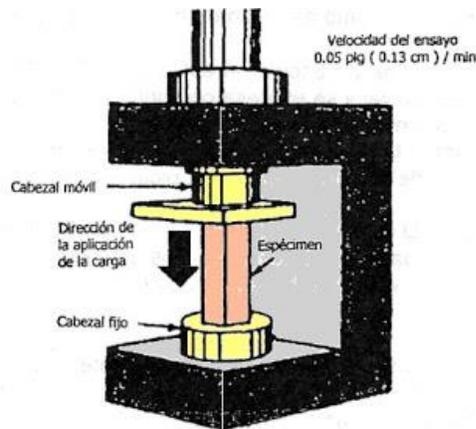


Figura 39. Ensayo de compresión para materiales sólidos.

En estos casos se pueden definir el esfuerzo y la deformación de ingeniería como:

$$\text{Esfuerzo de ingeniería: } s = \frac{F}{A}$$

$$\text{Deformación de ingeniería: } e = \frac{l - l_0}{l_0}$$

Donde F es la fuerza aplicada, A es el área transversal de la probeta, l_0 es la longitud inicial de la probeta y l es la longitud al finalizar la prueba. Los resultados para diferentes fuerzas, y por tanto esfuerzos y deformaciones, se presentan en un diagrama esfuerzo-deformación (Figura 40). en él se puede apreciar que el material experimenta inicialmente un comportamiento elástico (en el que si se suprime la fuerza el material recupera su forma y dimensiones), seguido de un comportamiento plástico (en el que el material sufre un deformación permanente) y finalmente sufre ruptura.

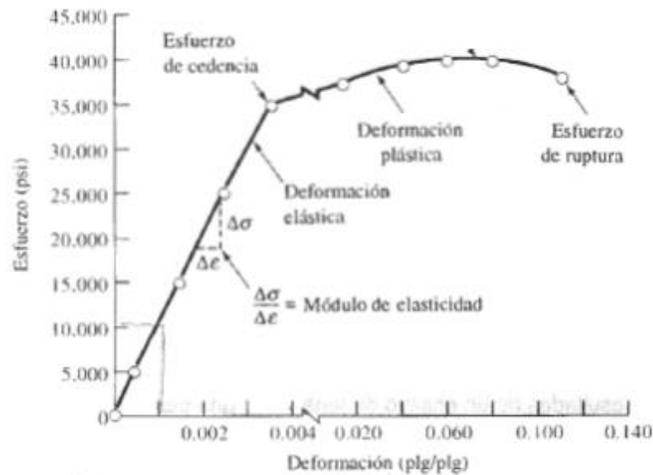


Figura 40. Diagrama esfuerzo-deformación, en un ensayo de compresión.

El ensayo de compresión permite obtener información importante de las propiedades mecánicas del material como es:

- Esfuerzo de cedencia: que corresponde al punto en el que la deformación plástica se vuelve importante, dividiendo el comportamiento elástico y plástico del material.
- Resistencia a la compresión: que se refiere al esfuerzo obtenido de la fuerza más alta aplicada, en el diagrama de esfuerzo-deformación se determina por el valor máximo de esfuerzo.
- Módulo de elasticidad de Young: corresponde a la pendiente de la curva esfuerzo-deformación en su región elástica, definido por la Ley de Hook. Está íntimamente relacionado con la energía de enlace de los átomos en el material, una pendiente muy pronunciada indica que se requieren grandes fuerzas para separar los átomos y provocar la deformación elástica del material y ello indica un modulo de Young alto, lo que para biomateriales es deseable.

$$E = \frac{s}{e}$$

- Modulo de resistencia: es el área bajo la porción elástica de la curva esfuerzo-deformación y corresponde a la energía elástica que un material absorbe o libera durante la aplicación de la carga, Para el caso de una comportamiento elástico ideal corresponde a la mitad del producto del esfuerzo de cedencia por la deformación de cedencia.



Figura 41. Compresor con contenedor para muestras confinadas.

CAPÍTULO 2

6 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

La obtención del cartílago sintético pHEMA-g-colágeno fue realizada en dos etapas fundamentalmente. Primero fue realizada la extracción del colágeno a partir de orejas de cerdo y posteriormente se llevó a cabo la polimerización vía radicales libres entre el colágeno y el HEMA variando la cantidad de colágeno en la reacción. Después de obtenidos los copolímeros a diferentes concentraciones en peso se efectuó la caracterización correspondiente, así como también la caracterización del colágeno y del pHEMA respectivamente.

6.1 Material

Primeramente fue elegida una fuente de extracción rica en colágeno tipo I y II debido a que es el principal componente biológico que integra al cartílago humano; se tenían varias opciones entre las cuales estaba la cola de res, el esqueleto de diversos peces, esternón de pollo, cola de ratón y orejas de cerdo. Se optó finalmente por las orejas de cerdo debido a la comodidad con la que pueden ser procesadas para realizar la extracción, así como también por su alto contenido de colágeno y poca grasa respecto a la cola de res o bien respecto a la cantidad necesaria de colas de ratón para extraer el colágeno. También se utilizó en el desarrollo experimental acetona BAKER, ácido acético MERCK, pepsina de mucosa gástrica porcina MERCK, agua desionizada, el monómero 2-Hidroxietilmetacrilato (HEMA) Sigma-Aldrich y el iniciador 2,2-Azo-bis-isobutironitrilo (AIBN) Sigma-Aldrich con pureza del 98%.

6.2 Extracción de colágeno:

Para realizar la extracción del colágeno fue necesario revisar varias técnicas utilizadas previamente, en las cuales se notó que coinciden algunos reactivos y pasos a pesar de extraer el colágeno de distintas fuentes como pescado, pollo, bovino, etc, en donde se elegía piel, tendón o hueso. A partir de estas técnicas de extracción se decidió desarrollar un método para extraer el colágeno de las orejas de cerdo, implementando desde la preparación de estas, hasta el tratamiento ácido y reactivos utilizados. Los pasos para realizar la extracción del colágeno fueron:

- 1) Se efectuó el lavado y enjuague de las orejas de cerdo utilizando agua destilada a 40°C y jabón líquido comercial.
- 2) Se realizó el desollamiento y depilación de cada oreja para remover la grasa y la velloidad presente. El material obtenido y los residuos fueron pesados

por separado en una balanza digital Sartorius BL210S. Los residuos fueron depositados en el bioterio del INB-UNAM para su posterior incineración. Se cortó el cartílago y cuero en cuadros de 5mm² aproximadamente.

- 3) Los cuadros de material porcino fueron lavados en acetona por 24h a temperatura ambiente con el fin de extraer la grasa excedente y otros componentes como la sangre. Posteriormente se filtró y enjuagó con agua destilada a temperatura ambiente hasta eliminar la acetona.
- 4) Se trituró el material obtenido utilizando un molino de aspas de acero Breville BB550LA y se colocó en un recipiente de acero a presión con agua destilada y fue sometido a calentamiento durante 2h, se filtró a vacío en tres ocasiones, se midió el pH del gel obtenido mediante un potenciómetro HANNA HI207 arrojando un pH de 8.
- 5) Se realizó una centrifugación a 20,000xg durante 20 minutos y a 4°C, utilizando una ultracentrífuga Beckman Coulter Avanti J-30I, con un rotor modelo JA-14. Posteriormente fue decantado el material eliminando la supernata (grasa).
- 6) Se efectuó el tratamiento ácido, añadiendo al gel una solución 0.5M de ácido acético, 0.005M de EDTA y 1g de pepsina de mucosa gástrica porcina por cada 100g de material a tratar. Se midió el pH de la solución y se colocó en agitación por 48h a temperatura ambiente, arrojando un pH de 3.3.
- 7) Se realizó una segunda centrifugación y eliminación de la supernata.
- 8) El pH del colágeno obtenido fue regulado de 3.3 a 8 con una solución 0.5M de NaOH.
- 9) Se determinó el porcentaje de sólidos en el gel de colágeno por diferencia de pesos y finalmente se llevó a refrigeración a 4°C.

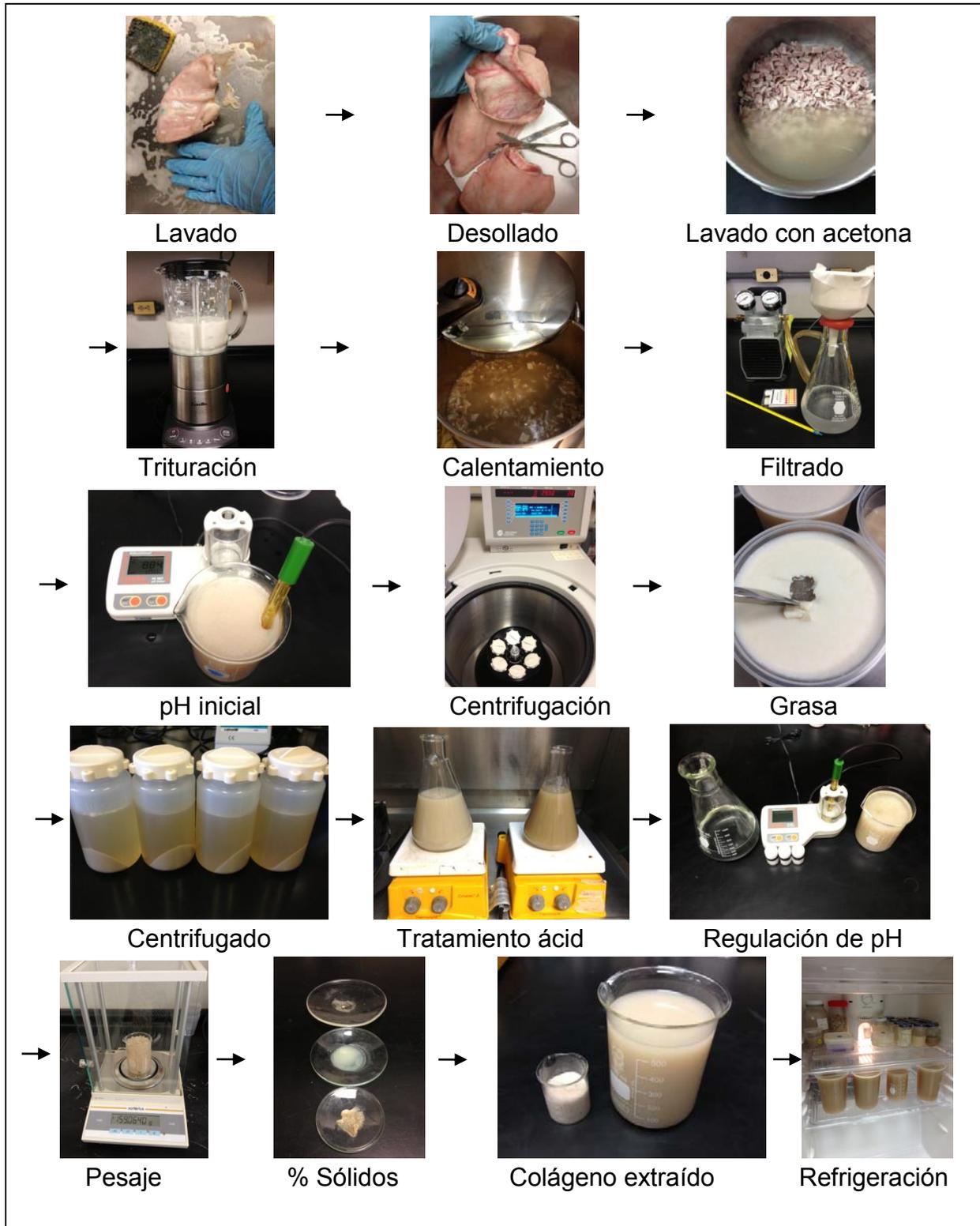


Figura 41. Proceso de extracción de colágeno.

6.3 Síntesis del copolímero pHEMA-g-colágeno:

Para la obtención del copolímero se revisaron los métodos estudiados a lo largo de los años y se implementaron algunas diferencias para la realización de reacción de polimerización como fue el uso de una lámpara de ultravioleta, los pasos realizados fueron los siguientes (Figura 42).

- a) Se pesó la cantidad de colágeno y agua necesaria para llevar a cabo la reacción de polimerización [Tabla 3] y se eliminó el exceso de oxígeno presente, burbujeando el gel a 75°C con Nitrógeno o Argón dentro del reactor durante 2 minutos.
- b) Se pesaron 10g de 2-Hidroxietil meta acrilato (HEMA) y 0.015g de iniciador 2,2-Azoisobutironitrilo (AIBN); inicialmente fueron añadidos 5g de HEMA en el reactor mezclándolos con el colágeno y agua mediante agitación continua y manteniendo una temperatura de 75°C, se disolvió el iniciador en 1mL de acetona y se adicionó posteriormente en los 5g de HEMA restantes. Finalmente se añadió el HEMA con el iniciador al reactor y registró el tiempo.
- c) La solución dentro del reactor fue visualizada respecto al aumento de viscosidad y se retiró al copolímero formado colocándolo en moldes de alginato o vidrio. Los moldes de alginato fueron construidos de manera artesanal dando la forma del cartílago corporal deseado, en este caso se eligió la forma de los meniscos lateral, medial de la rodilla y pabellón auricular
- d) El copolímero obtenido fue introducido en un horno a 75°C y durante 1 hora.
- e) Se irradió al copolímero mediante una lámpara de UV durante 24h con el fin de asegurar la terminación de la polimerización, utilizando una lámpara Endela UVGL58 (254-366nm, 115V y 0.16A).
- f) Se retiró de los moldes el material polimérico de los moldes y se lavó en repetidas ocasiones con agua destilada.
- g) Finalmente el copolímero pHEMA-g-colágeno fue guardado en refrigeración a 4°C en frascos de vidrio cerrados con agua destilada (Figura 43).

HEMA [g]	Colágeno [g]	H2O [g]	AIBN [g]
10	0.0	20.0	0.015
10	0.5	19.5	0.015
10	1.0	19.0	0.015
10	1.5	18.5	0.015
10	2.0	18.0	0.015
10	3.0	17.0	0.015

Tabla 3. Relación en peso HEMA/colágeno en la síntesis del copolímero.

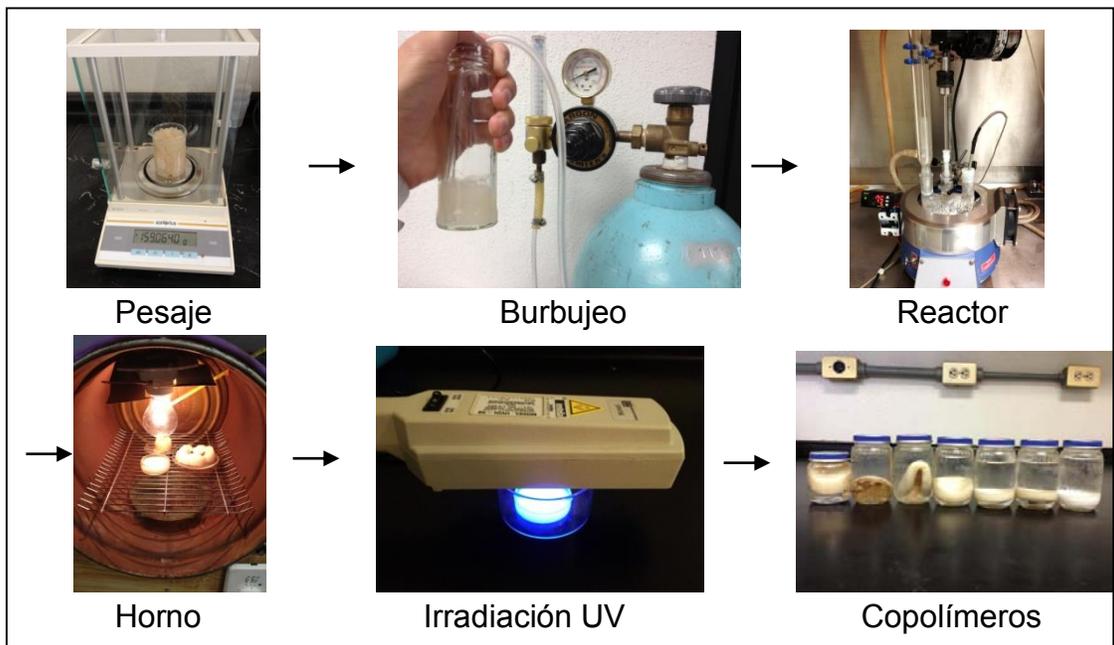


Figura 42. Síntesis del copolímero pHEMA-g-colágeno.

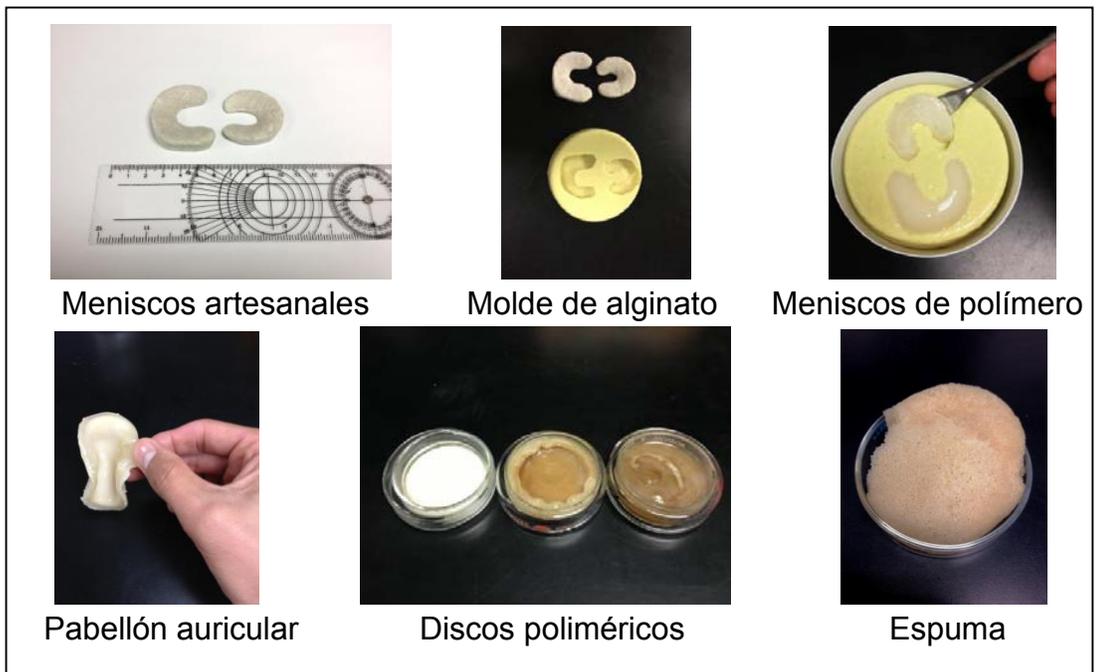


Figura 43. Moldeo del copolímero.

6.4 Técnicas de caracterización.

6.4.1 Electroforesis en gel (SDS-PAGE).

Esta técnica fue realizada con la finalidad de obtener el peso molecular del colágeno extraído. Se prepararon soluciones de colágeno concentradas y diluidas, así como dos muestras de gelatinas porcina y bovina comercial como muestras comparativas. El método realizado en esta técnica fue Laemmli y se siguió el protocolo de laboratorio para la preparación del gel separador, gel concentrador, así como el uso de marcadores, teñimiento y desteñimiento del gel (Figura 44). El equipo y marcadores utilizados en la técnica fueron BioRad Power Pac 1000. Después de la preparación de los geles fue montado el equipo y colocadas las muestras de colágeno y caleidoscopio en los carriles (Tablas 4 a la 7). La corrida fue realizada a 100 V por 30 minutos y posteriormente aumentada a 120 V hasta que las muestras migraron al final del carril. Posteriormente fue teñido el gel con azul de coomasie y finalmente lavado por 3h con la solución para desteñir.

Reactivo	Cantidad para 2 geles
Agua destilada	3.05mL
TRIS 1.5M pH 6.8	1.25mL
SDS 10% (w/w)	50 μ L
Acrilamida/BIS	0.65 μ L
Persulfato de Amonio 10%	25 μ L
TEMED	5 μ

Tabla 4. Preparación del gel concentrador.

Reactivo	Cantidad para 2 geles
Agua destilada	4.85mL
TRIS 1.5M pH 6.8	2.5mL
SDS 10% (w/w)	100 μ L
Acrilamida/BIS	2.5mL
Persulfato de Amonio 10%	10 μ L
TEMED	5 μ

Tabla 5. Preparación del gel separador.

Metanol	500mL
Ácido acético	100mL
Agua destilada	400mL
Azul de coomasie	2.5g

Tabla 6. Solución para teñir

Metanol	150mL
Ácido acético	100mL
Agua destilada	750mL

Tabla 7. Solución para desteñir



Figura 44. Técnica de electroforesis.

6.4.2 Espectroscopia de infrarrojo (FTIR).

Se realizó esta técnica con el fin de obtener y analizar las bandas características del espectro de infrarrojo de cada material las cuales se relacionan directamente con la presencia de los grupos funcionales de cada compuesto presente en la muestra. Esta técnica nos permite analizar la modificación del copolímero al observar la ruptura o formación de enlaces químicos. Se utilizó un espectroscopio PerkinElmer Versión 10.03.07. Se cortó cada muestra por analizar en forma de película de 1mm de espesor, 5mm de diámetro y se secó en un horno a vacío a 35°C por 24h con el fin de eliminar el agua absorbida (Figura 45). Las muestras analizadas fueron el Colágeno, HEMA y los copolímeros pHEMA-g-colágeno: 10/0.5g, 10/1g, 10/1.5g, 10/2g, 10/3g.



Figura 45. Horno a vacío y espectroscopio de infrarrojo.

6.4.3 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Por medio de esta técnica fue posible observar morfología del colágeno, pHEMA y pHEMA-g-colágeno al monitorear en un Microscopio JEOL-JSM-6060LV a 15 V y acercamientos de x20, x100, x500 y x1000. Cada muestra por analizar fue secada en un horno a vacío a 35°C durante 24h para eliminar el agua absorbida por el material (Figura 45), posteriormente fue sumergida en nitrógeno líquido con el fin de fracturar al material sin deformar la parte por analizar, que en este caso es el interior cada material. Finalmente el material fue montado en stubs y recubierto con oro mediante la técnica de sputtering en una evaporadora Sputter Coater EMS 550 en tres ocasiones para generar conductividad eléctrica en el material y poderlo observar (Figura 46).

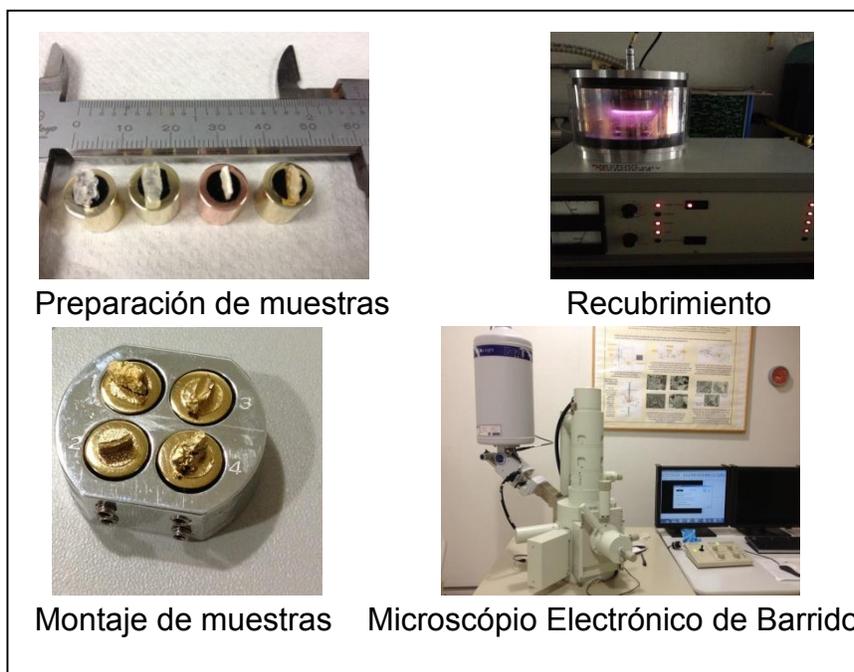


Figura 46. Preparación de muestras para SEM.

6.4.4 Análisis Térmico: Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

Se realizó esta técnica con el fin de obtener y analizar la temperatura de descomposición y temperatura de transición vítrea de cada material. Por medio de la Calorimetría Diferencial de Barrido se buscó la temperatura de transición vítrea del pHEMA y del colágeno, una vez identificada se buscó la correspondiente a cada copolímero pHEMA-g-colágeno para observar si hubo alguna modificación y por lo tanto comprobar que el material está sufriendo una modificación en su estructura y por lo tanto en su comportamiento térmico.

El Análisis Termogravimétrico se realizó con el fin de obtener el comportamiento térmico de descomposición y realizar las comparaciones entre los materiales respectivamente. Las muestras fueron preparadas realizando un corte de cada muestra por analizar de tal manera que pesaran 5mg y pudieran ser introducidas en las charolas de platino. Cada muestra fue secada previamente en un horno a vacío a 35°C por 24h (Figura 47), el equipo utilizado fue TA Instruments DSC Q100 de 0°C a 300°C en atmósfera de nitrógeno y a una velocidad de calentamiento de 10°C/min en el caso de la Calorimetría Diferencial de Barrido y TA Instruments TGA Q5000IR de 20°C a 600°C en atmósfera de nitrógeno y a 10°C/min de velocidad de calentamiento. Las muestras analizadas fueron las siguientes:

- Colágeno.
- HEMA.
- pHEMA-g-colágeno: 10/0.5g, 10/1g, 10/1.5g, 10/2g, 10/3g.

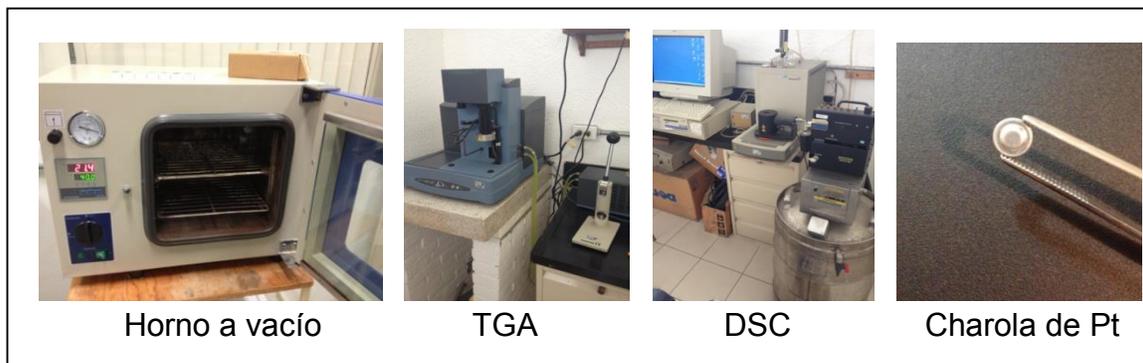


Figura 47. Análisis térmico.

6.4.5 Ensayo de compresión.

Esta prueba fue realizada con el fin de evaluar el comportamiento mecánico de cada uno de los copolímeros obtenidos basándose en pruebas reportadas en la literatura. Las muestras de copolímero pHEMA-g-colágeno analizadas por esta técnica fueron cortadas previamente en húmedo en forma de discos de 10mm de diámetro y 10mm de espesor utilizando una pieza de acero inoxidable en forma de sacabocados y mediante un taladro a 125rpm (Figura 48). Se realizaron pruebas mecánicas de compresión confinadas y sin confinar utilizando un aparato de pruebas mecánicas INSTRON 5500R model 1125. En las pruebas mecánicas confinadas se colocó el disco de copolímero dentro de un contenedor de acero construido especialmente en el taller mecánico para recibir en su interior al disco de copolímero. Para los dos tipos de pruebas se realizó una compresión de 5mm/min hasta llegar al 50% de deformación (Figura 49).

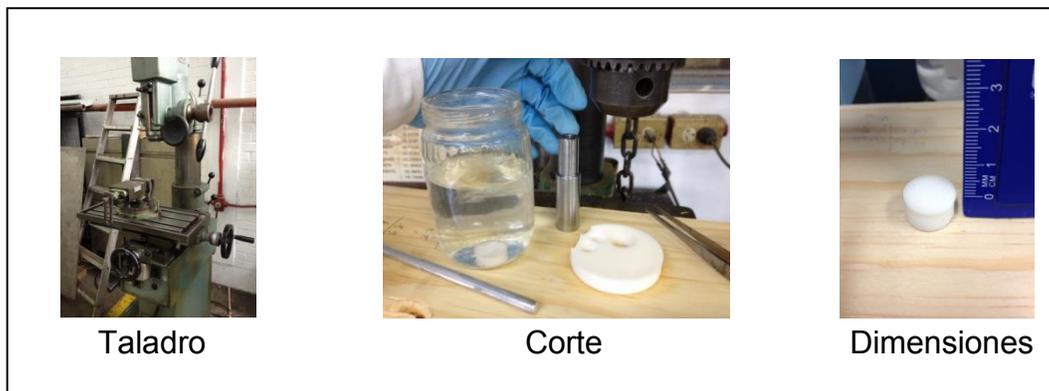


Figura 48. Preparación de las muestras para ensayo mecánico.

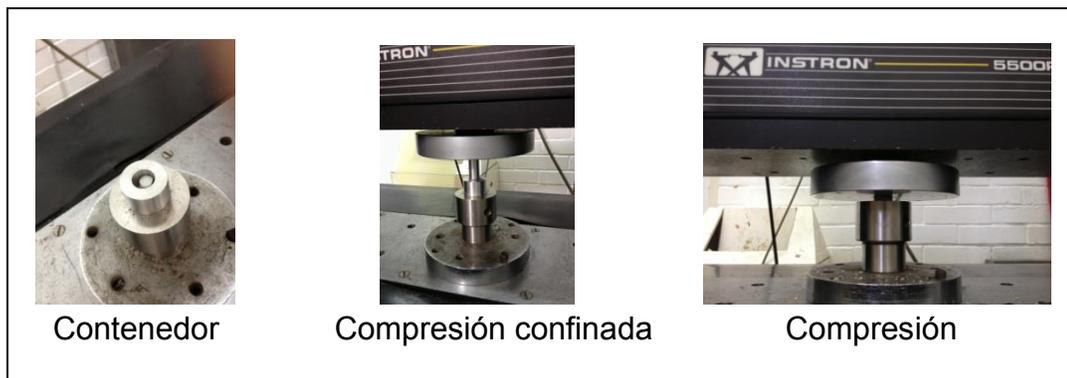


Figura 49. Pruebas mecánicas de compresión.

CAPÍTULO .3

7 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1 Electroforesis en gel (SDS-PAGE).

El estándar BioRad Prestained (161-0375) es una muestra de referencia de una mezcla de proteínas que sirve como blanco para el cálculo del peso molecular al ser comparado el rastro que deja en el gel, con el de una proteína por analizar como en este caso el colágeno. La **Figura 50** muestra el gel electroforético obtenido en la técnica realizada, en donde en el carril 1 podemos observar los rastros reportados por BioRad Prestained para el estándar (161-0375) con el peso molecular reportado, mientras que en el carril 2 podemos observar los rastros dejados por el colágeno. Se midió la distancia recorrida por cada rastro dejado en el gel (**tabla 8**) y se obtuvo la gráfica (**Figura 51**) que sirvió de patrón de referencia para calcular el peso molecular del colágeno:

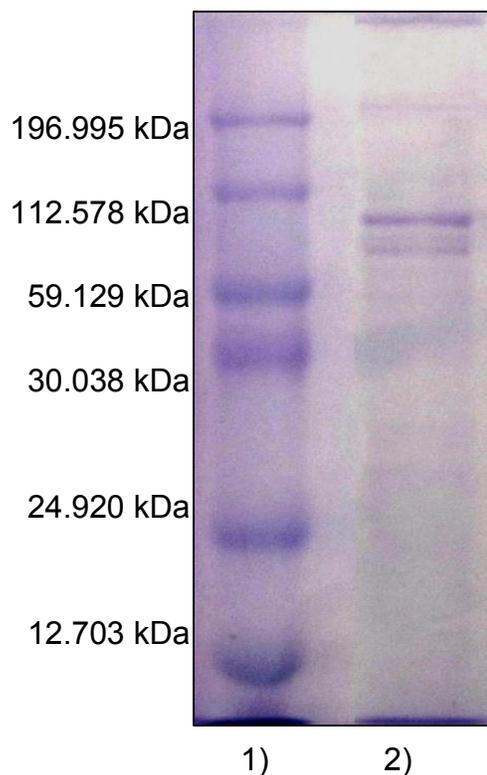


Figura 50. Movilidad de las proteínas en el gel.
1) Estándar BioRad Prestained (161-0375), 2) Colágeno extraído.

PM [kDa]	Rf [mm]
196.995	4.5
112.578	9.2
59.129	13.2
30.038	22.9
24.92	32.4
12.703	43.5

Tabla 8. Pesos moleculares del estándar (161-0375) y distancias medidas.

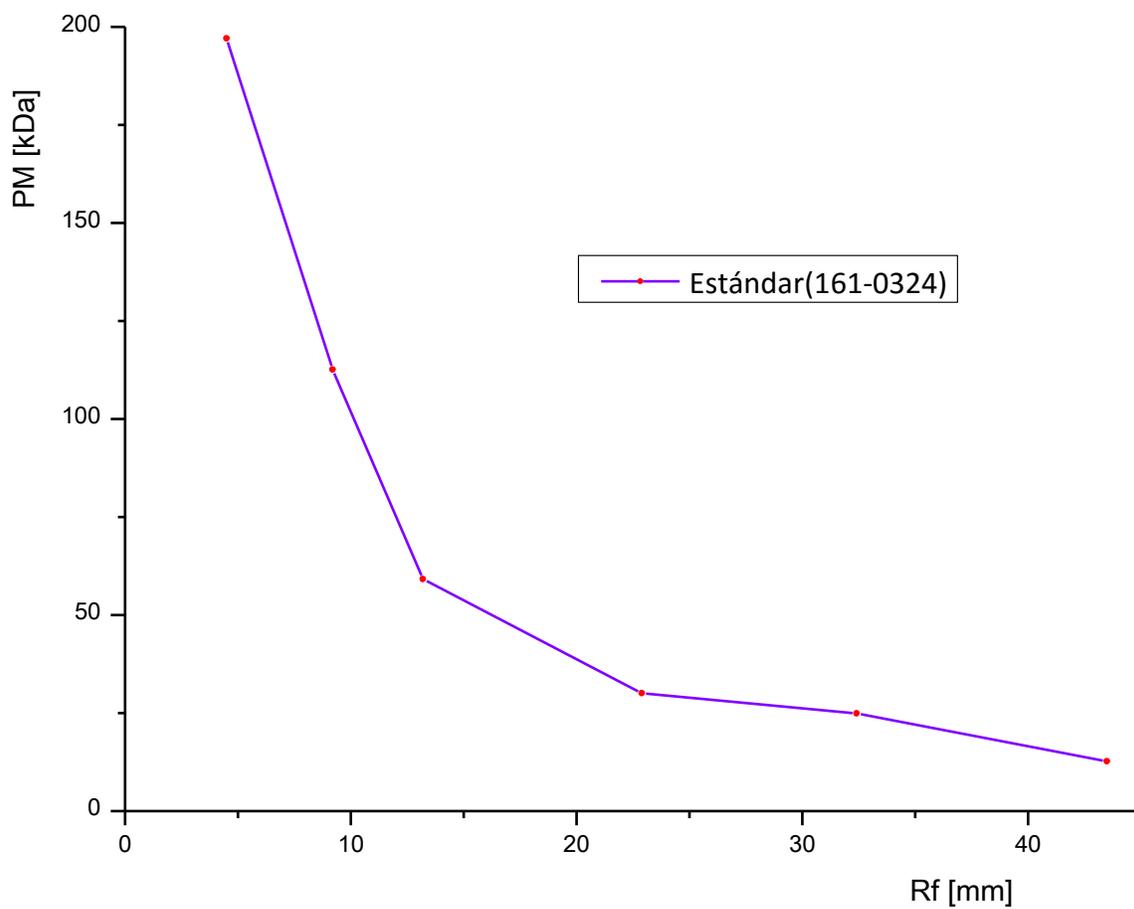


Figura 51. Curva patrón de pesos moleculares del estándar (161-0375).

La **Figura 52** muestra la gráfica y la ecuación obtenida mediante el arreglo lineal entre los rastros del patrón de referencia y los del colágeno. La **Tabla 9** muestra las distancias medidas en el carril 2 correspondientes a la movilidad del colágeno en el gel y el peso molecular calculado por medio de la ecuación mostrada en el arreglo lineal. Finalmente el peso molecular calculado del colágeno fue de 92, 55 y 195 kD respectivamente.

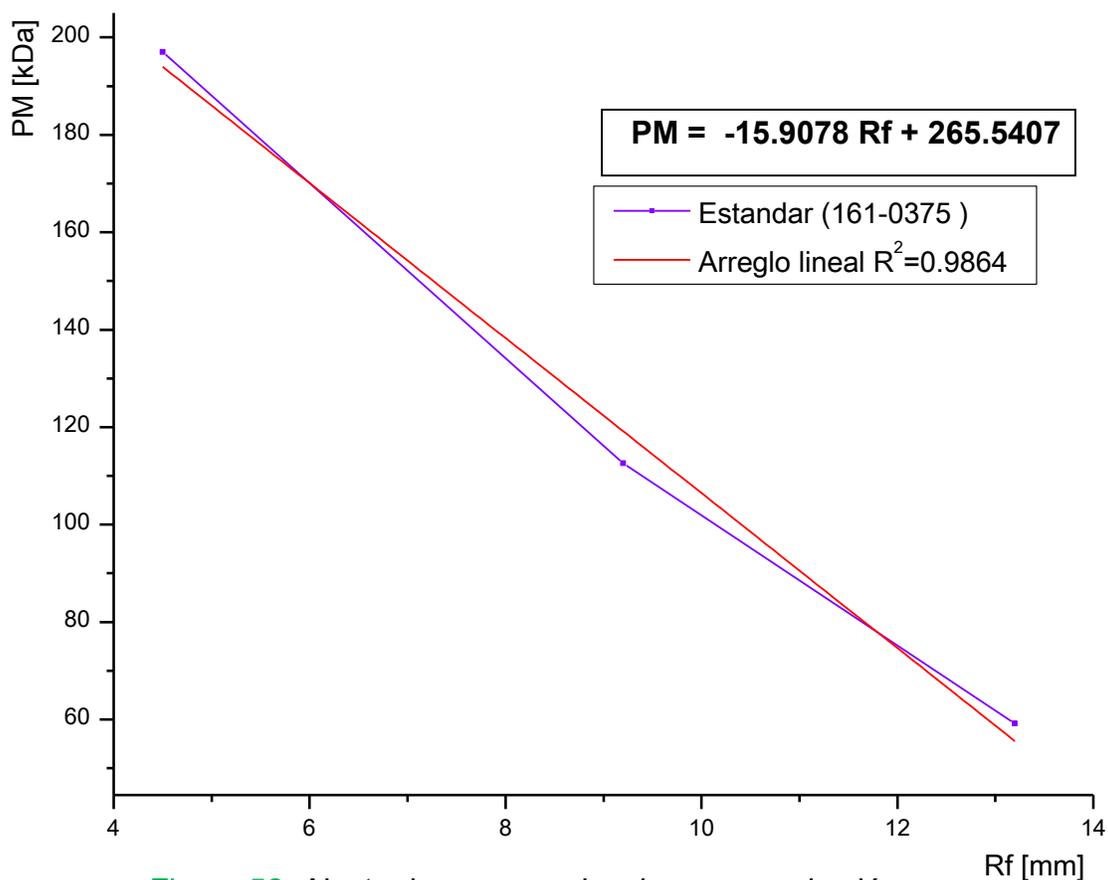


Figura 52. Ajuste de pesos moleculares para el colágeno.

Rf [mm]	PM [kDa]
4.4	195.5595
10.9	92.1498
13.2	55.5577

Tabla 9. Pesos moleculares del colágeno extraído.

7.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Mediante esta técnica fue posible observar la morfología de cada material, en la **Figura 53** se observan las micrografías del cartílago natural obtenido de las orejas de cerdo a varios acercamientos x1000, x2500, x5000 y x10000 respectivamente, en estas micrografías se puede observar que el cartílago tiene una morfología irregular, en donde se puede observar que tiene una superficie rugosa en general, sin embargo también se puede observar algunas fibras que pueden ser atribuidas a la interfase entre el cuero y el cartílago de cerdo.

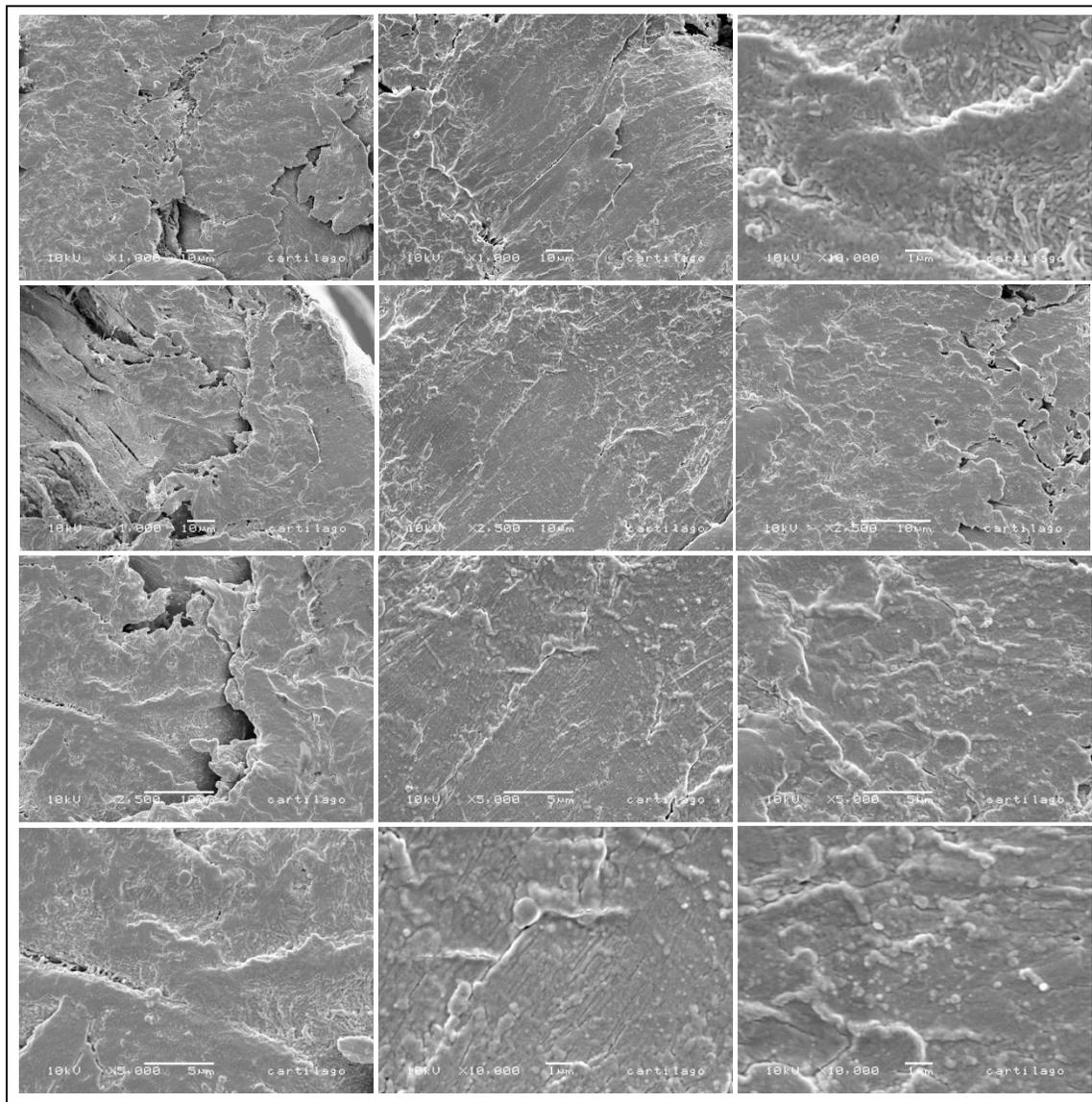


Figura 53. Micrografías del cartílago de la oreja de cerdo (x1000, x2500, x5000, x10000)

En el caso del colágeno extraído **Figura 54** se observa que el material presenta una forma irregular, en algunas zonas se puede ver la presencia de gránulos que probablemente correspondan a impurezas como residuos de grasa o alguna proteína. En las micrografías de la **Figura 54** se puede observar que la superficie presenta algunas estrías, sin embargo estas son debido a la forma en la que fue preparada la muestra al romperla para analizarla y también se observan algunos poros que pueden deberse a burbujas al secar el material.

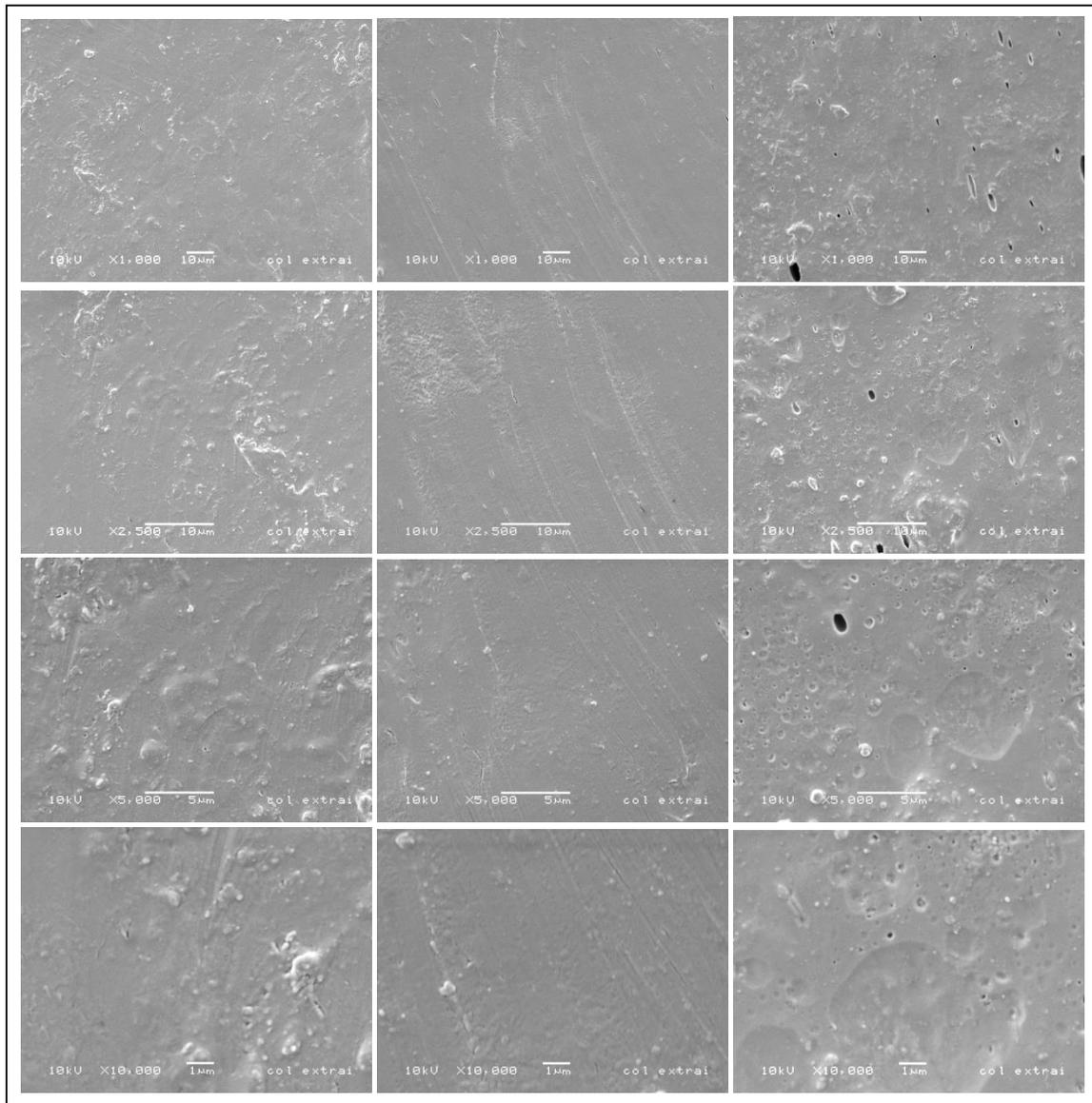


Figura 54. Micrografías del colágeno extraído (x1000, x2500, x5000, x10000).

En la **Figura 55** se muestran las micrografías del pHEMA, en donde se observa una morfología que puede ser considerada como lisa a diferencia del caso del colágeno o del cartílago (**Figuras 53 y 54**), también pueden observarse algunos gránulos correspondientes probablemente a las presencia de impurezas o residuos del material al fragmentar la muestra en la preparación para el análisis.

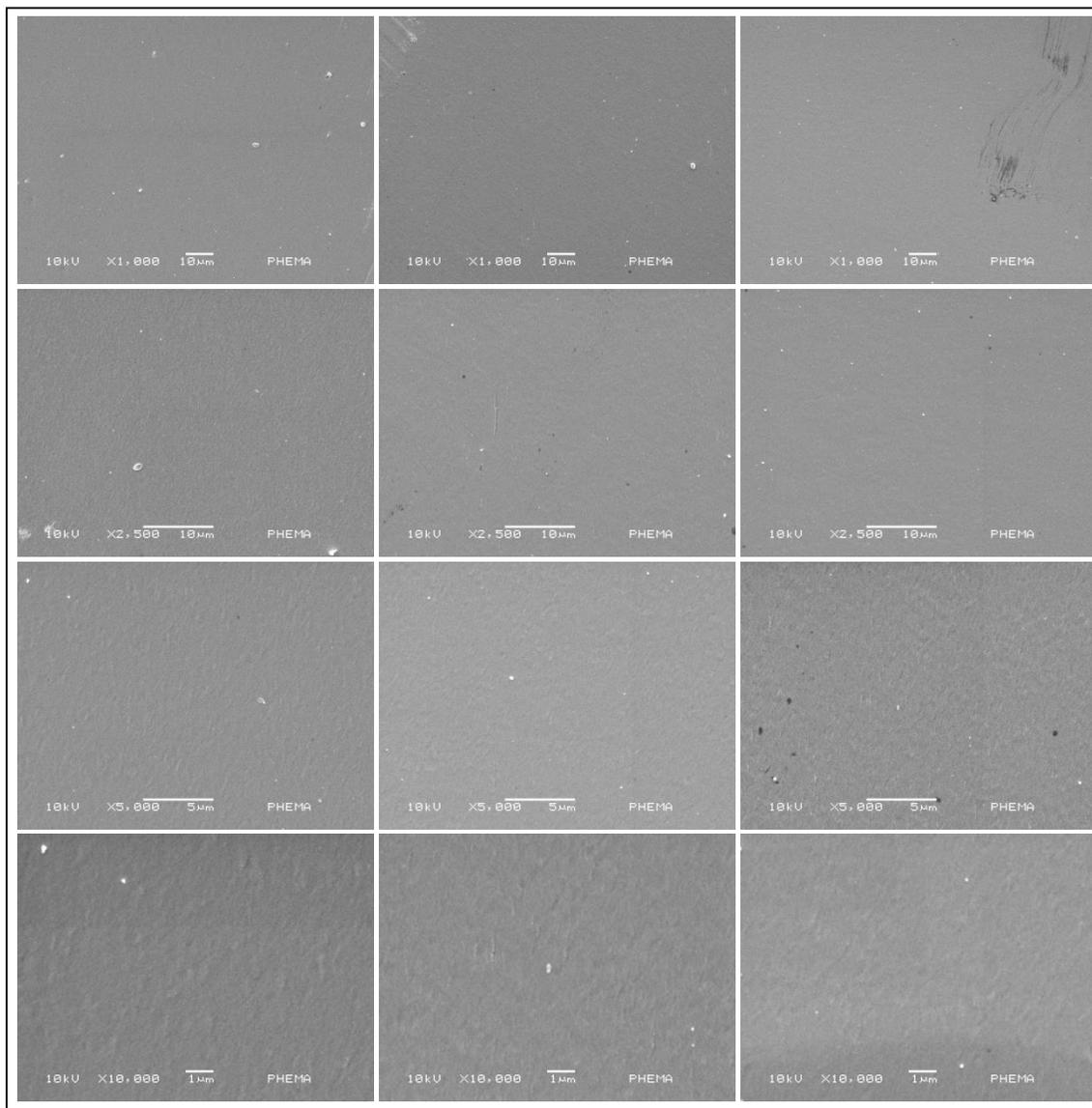


Figura 55. Micrografías del pHEMA puro (x1000, x2500, x5000, x10000).

Al analizar la morfología en el caso del copolímero pHEMA-g-colágeno en las micrografías de las Figuras 56, 57, y 58 se observa una morfología intermedia en la con respecto al pHEMA y el colágeno ya que pueden observarse zonas lisas y zonas rugosas en los distintos acercamientos, también puede notarse que a medida en que incrementa la cantidad de colágeno con respecto a la concentración en peso en el copolímero la superficie se vuelve menos uniforme y se asemeja más a la mostrada en el colágeno puro (Figura 54). En algunas de las micrografías mostradas en las figuras Figuras 56, 57, y 58 se observa la presencia de algunos poros en el material, estos pueden ser atribuidos a fallas en la preparación de la muestra como la presencia de burbujas o bien existe la posibilidad microporos atribuidos a la permeabilidad del material.

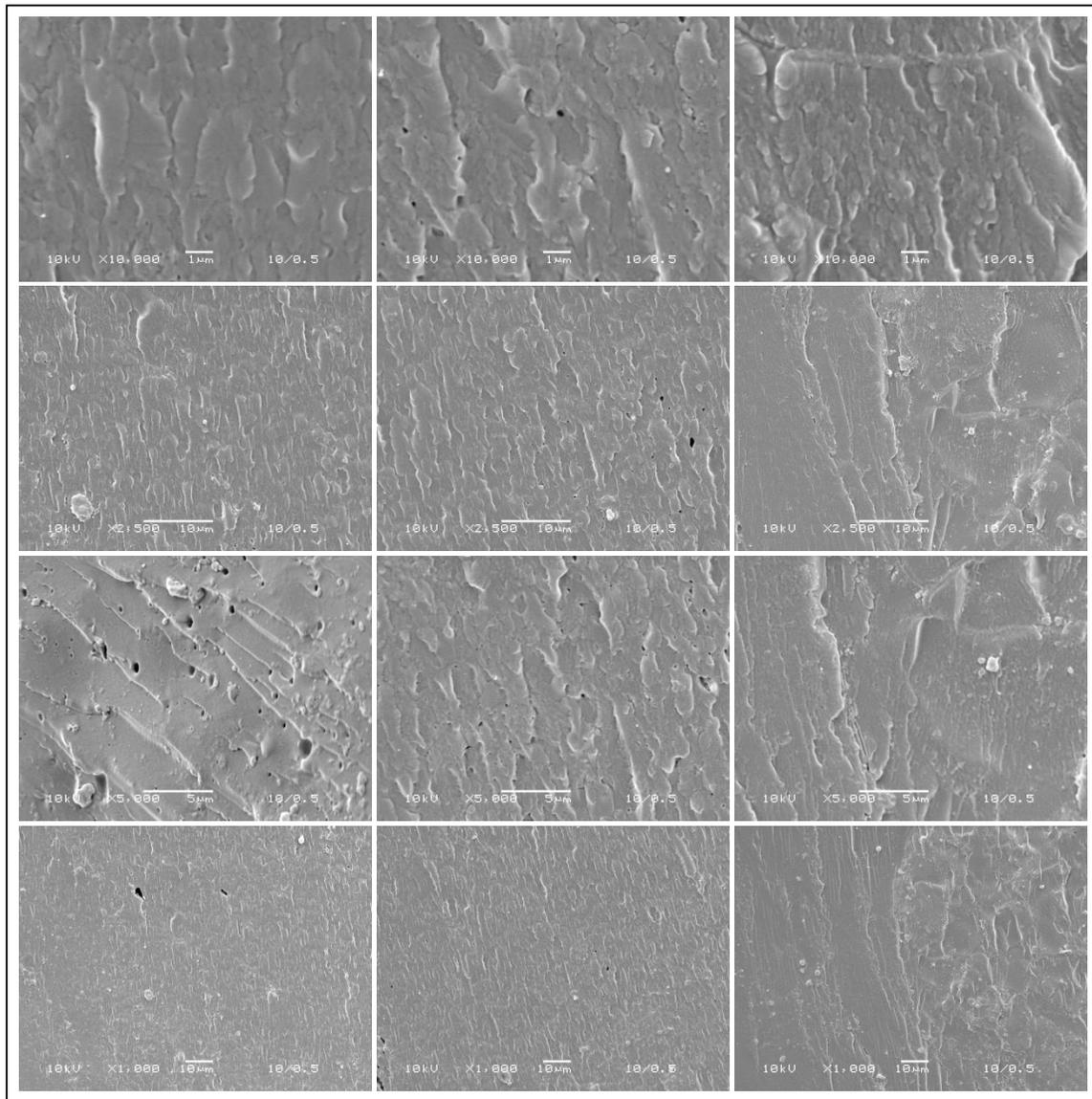


Figura 56. Micrografías del pHEMA-g-colágeno 10g/0.5g (x1000, x2500, x5000, x10000).

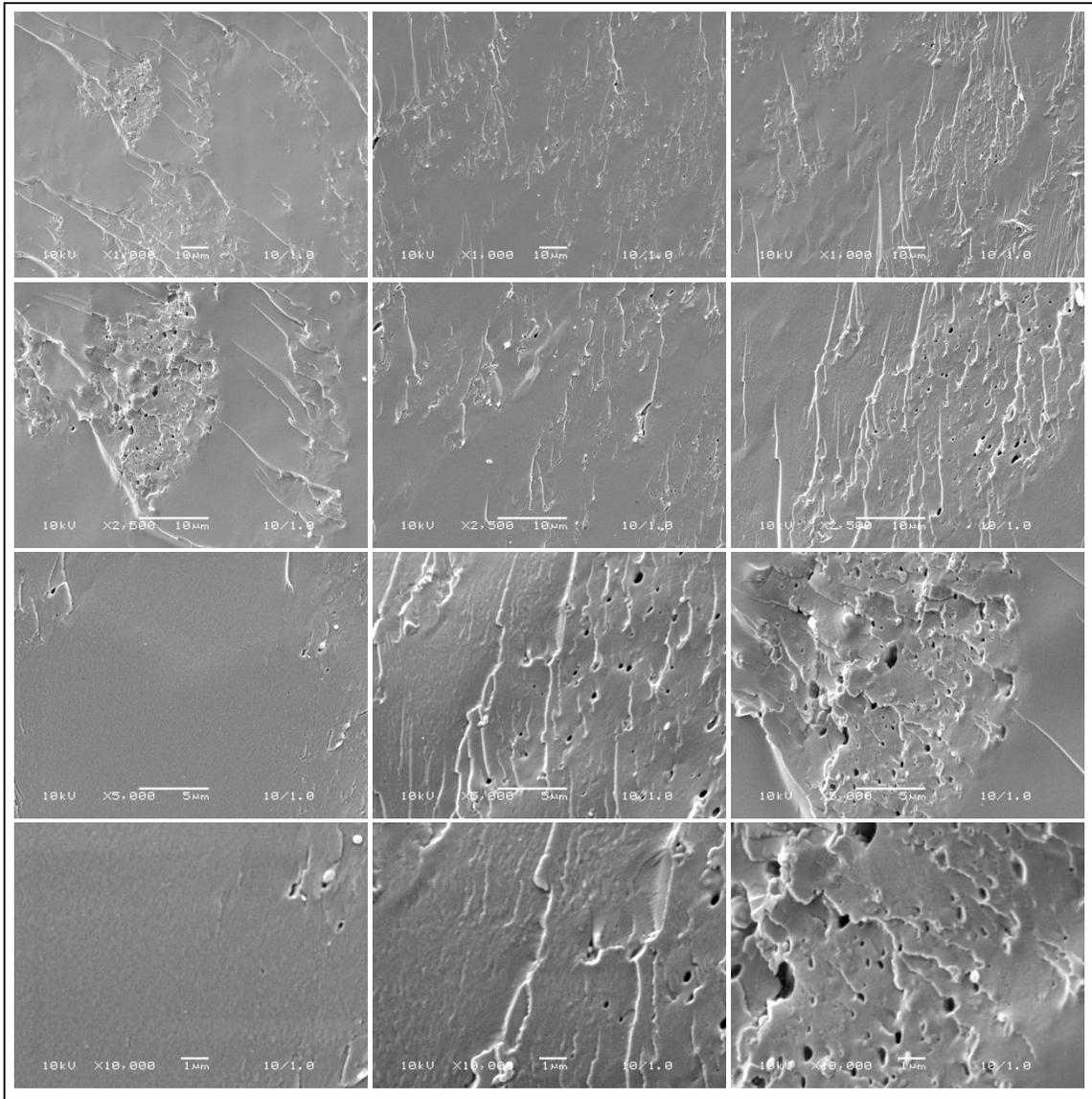


Figura 57. Micrografías del pHEMA-g-colágeno 10g/1.0g (x1000, x2500, x5000, x10000).

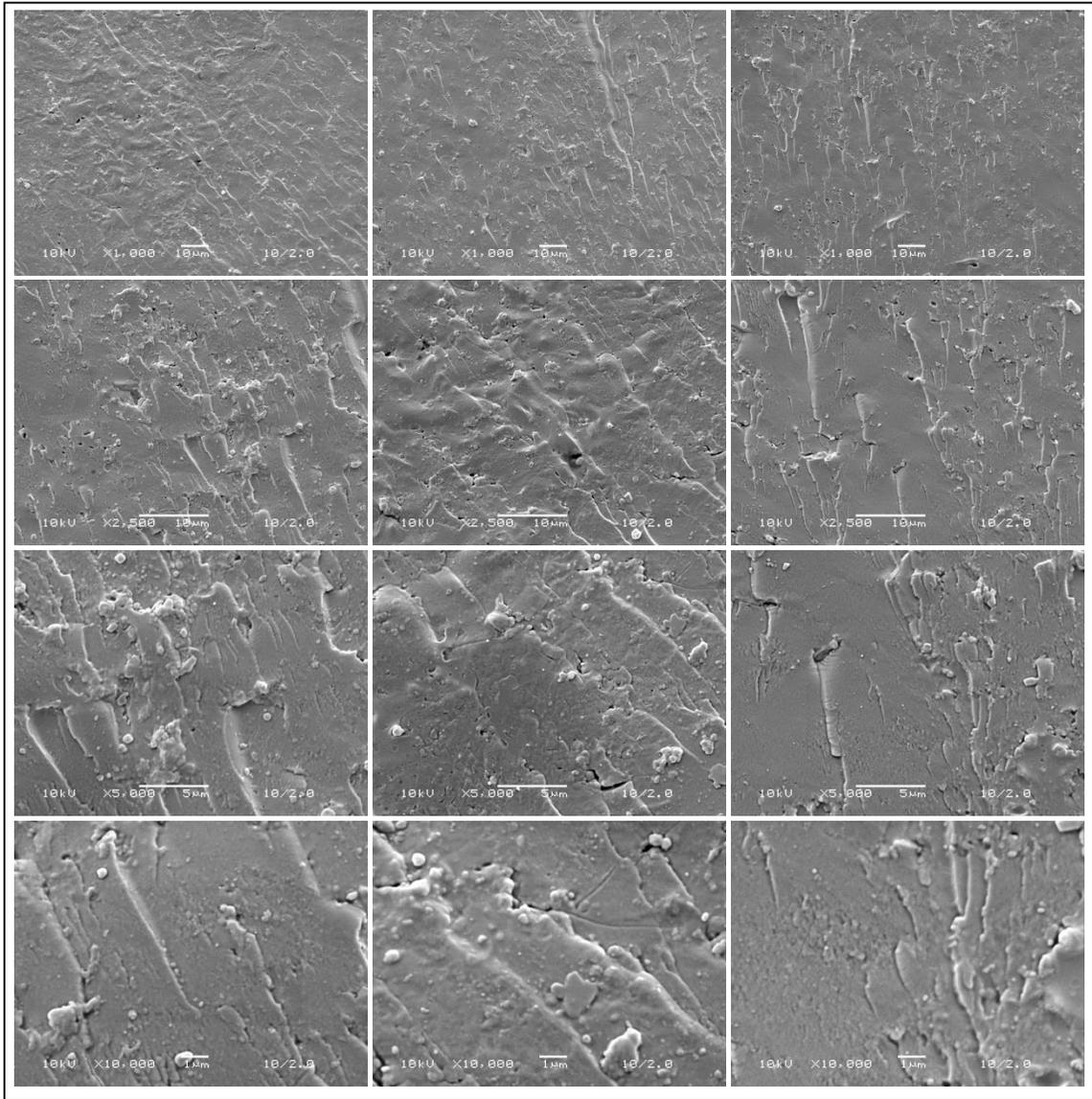


Figura 58. Micrografías del pHEMA-g-colágeno 10g/2.0g (x1000, x2500, x5000, x10000).

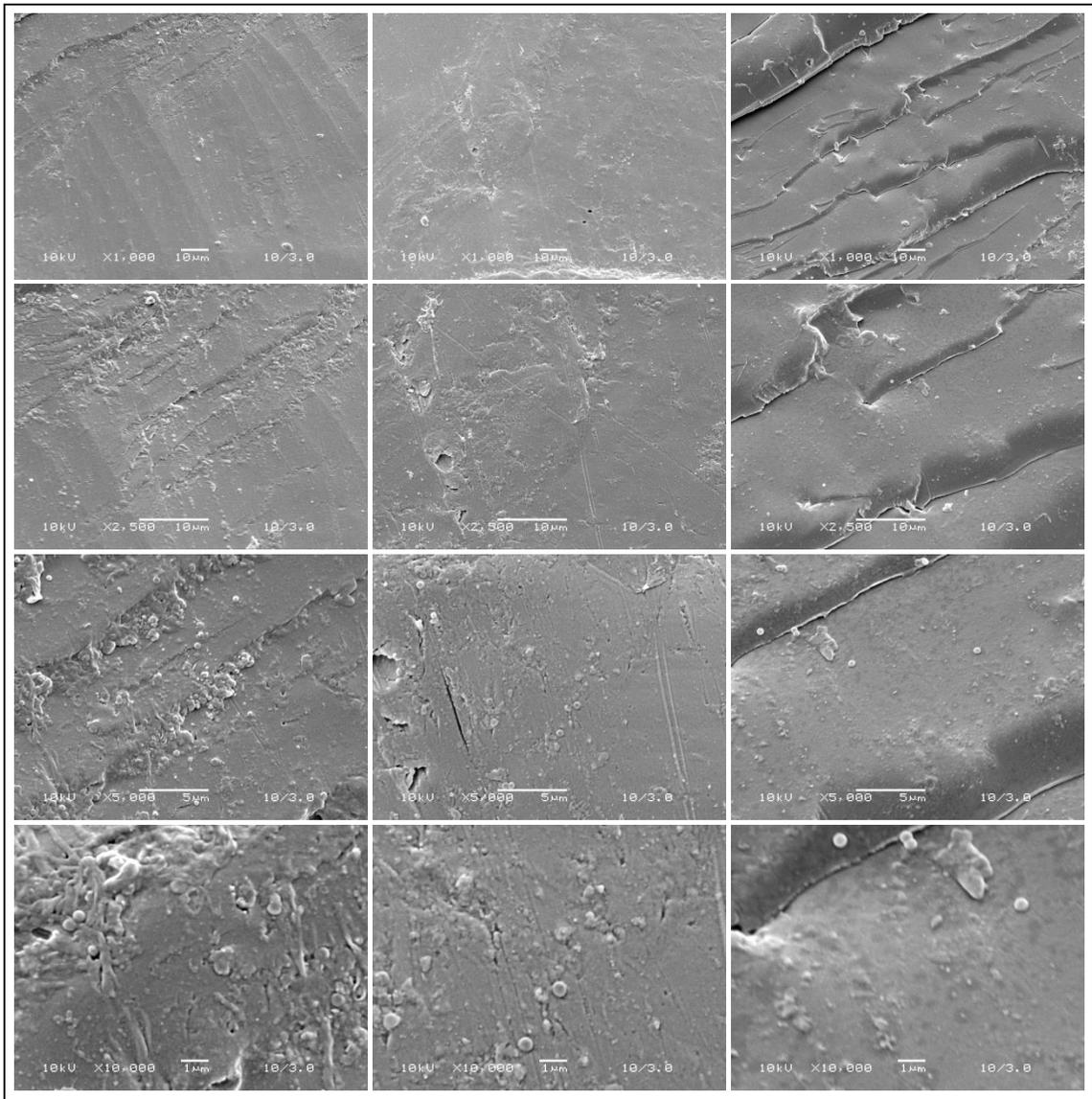


Figura 59. Micrografías del pHEMA-g-colágeno 10g/3.0g (x1000, x2500, x5000, x10000).

7.3 Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR).

Al analizar el espectro de infrarrojo del colágeno extraído de las orejas de cerdo se observan las bandas características correspondientes a los grupos funcionales de los aminoácidos que integran a esta proteína, siendo básicamente los grupos amino II y amida II debido a los enlaces peptídicos que los unen (**Figura 60**), los porcentajes que integran al colágeno tipo I y II indican que la glicina, hidroxiprolina y prolina se encuentran en mayor cantidad en las cadenas, sin embargo pueden integrar hasta veinte aminoácidos diferentes, en donde lo que varía es el radical -R. Por lo tanto se puede observar en el colágeno extraído la presencia de los modos vibracionales (N-H) de amida II y amina II, (-CH₂-), (C-C), (C=O) amida II, (C-N) de amina II y amida II, los cuales se muestran en la **Tabla 9** y en la **Figura 61** respectivamente.

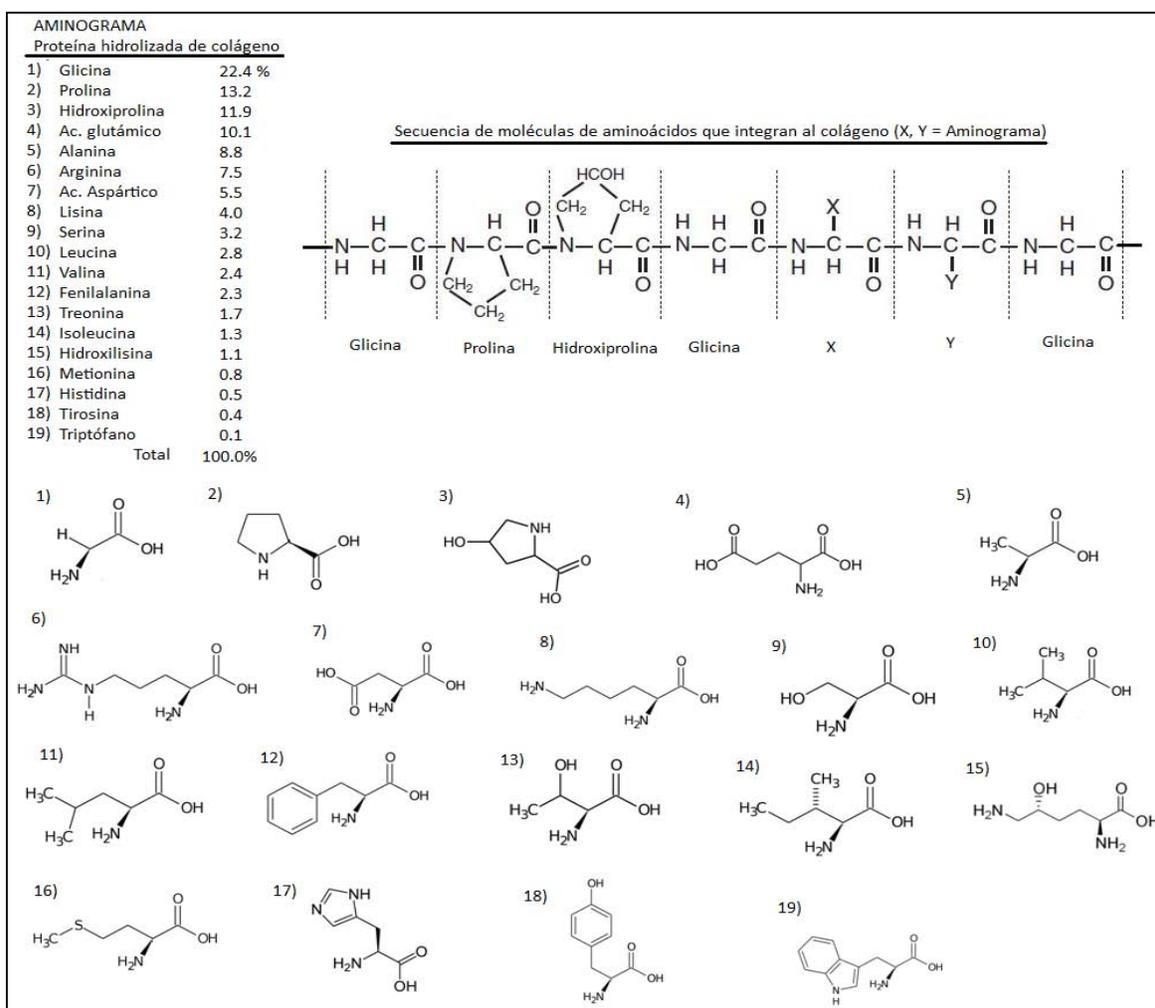


Figura 60. Estructura general de los aminoácidos que integran al colágeno.

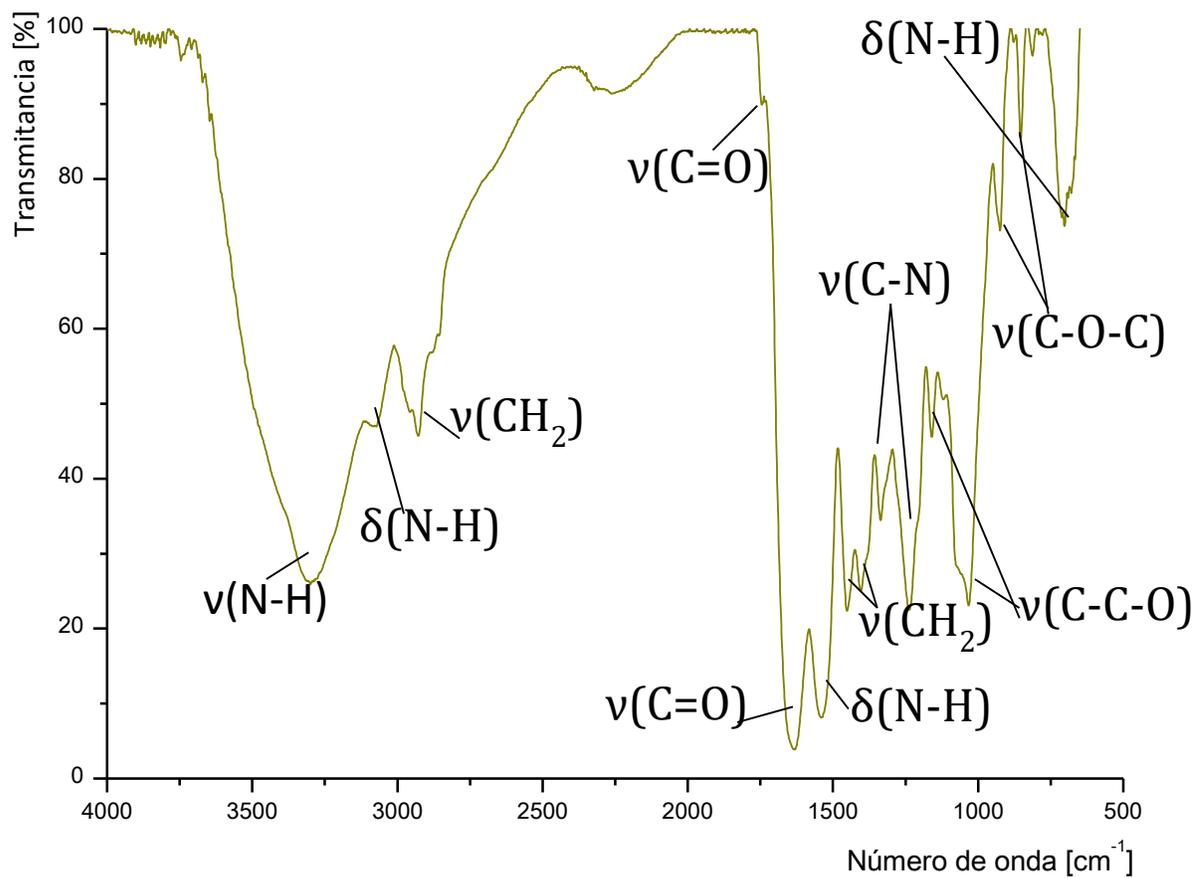


Figura 61. Espectro de infrarrojo del colágeno extraído.

Número de onda [cm ⁻¹]	Vibración
3299	v(N-H) amida II, amina II
3073	δ(N-H) sobretono amida II
2928	v(CH ₂) asimétrico
2856	v(CH ₂) simétrico
1744	v(C=O) éster
1633	v(C=O) amida II
1542	δ(N-H) en el plano amida II
1452	v(CH ₂) tijera
1405	v(CH ₂) meneo
1337	v(C-N-C) amina II
1238	v(C-N) amida II
1160, 1034	v(C-N) amina II
924	v(O-C-C) éster
854, 820	v(C-O-C) éster
703	δ(N-H) amida II, meneo amina II

Tabla 9. Modos de vibración del colágeno.

En la **Figura 62** se muestra el espectro de infrarrojo del PHEMA en el cual se observan los modos de vibración característicos como el (-OH) a 3375 cm⁻¹, el carbonilo (C=O) a 1720 cm⁻¹ perteneciente a los ésteres y los grupos metilo y metileno 2971 cm⁻¹ y 2933 cm⁻¹ principalmente (**Figuras 63 y 64**), cada uno de los picos mostrados es reportado en la **tabla 10**.

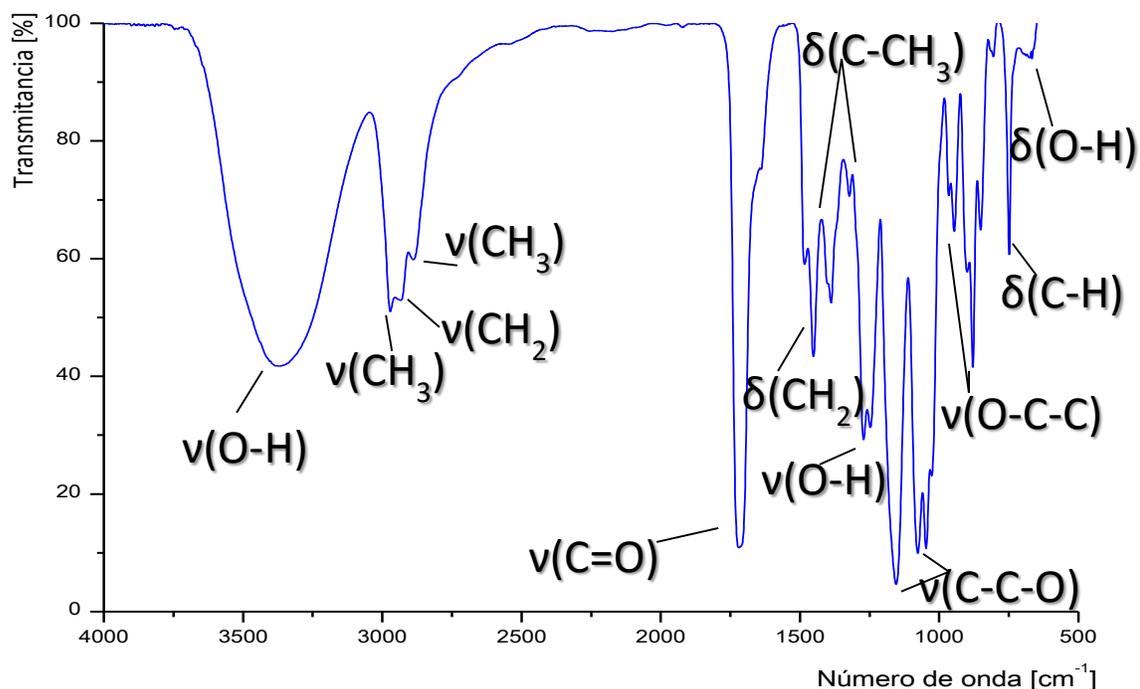


Figura 62. Espectro de infrarrojo del pHEMA.

Número de onda(cm ⁻¹)	Vibración
3375	v(O-H)
2971	v(CH ₃) asimétrico
2933	v(CH ₂) asimétrico
2884	v(CH ₃) simétrico
1720	v(C=O) éster
1484	δ(C-CH ₃)
1452	δ(CH ₂)
1388	δ(C-CH ₃) sombrilla
1324	v(O-H)
1272	v(CH ₂) menea
1247,1155	v(C-C-O) éster
1076, 1047, 946	v(O-C-C) éster
879, 852	δ(C-H) vinilideno
810,749	δ(C-H) fuera del plano vinilideno
690	δ(O-H)

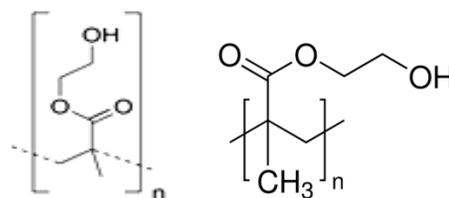


Figura 63. Estructura del pHEMA.

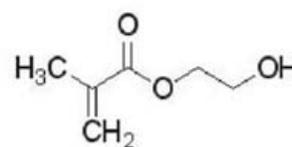


Figura 64. Estructura del HEMA.

Tabla 10. Modos de vibración característicos del pHEMA.

En la **Figura 65** se observa el espectro de infrarrojo del pHEMA-g-Colágeno correspondiente 10/3g en relación en peso, los modos vibracionales del copolímero se muestran en la **Tabla 11**, en donde puede distinguirse que es muy similar al espectro de infrarrojo del pHEMA puro (**Figura 62**).

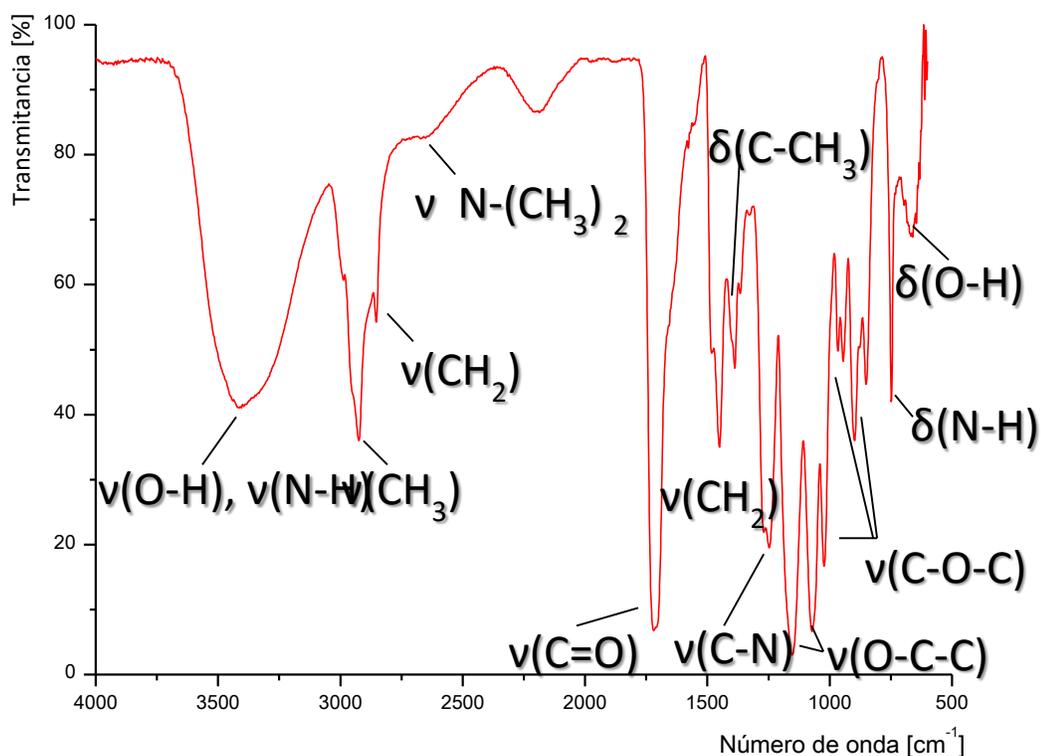


Figura 65. Espectro de infrarrojo del pHEMA-g-Colágeno 10/3g.

Número de onda(cm ⁻¹)	Vibración
3385	ν(O-H), ν(N-H)
2960	ν(CH ₃) asimétrico
2890	ν(CH ₂) asimétrico
1709	ν(C=O) éster
1650	ν(C=O) amida II, amina III
1485	ν(CH ₂) tijera
1454	δ(CH ₂)
1389	δ(C-CH ₃) sombrilla
1365	ν(O-H)
1275	ν(C-N) amina III
1250	ν(C-N) amida II, amina III
1160	ν(C-N) amina II
1075, 1025	ν(O-C-C) éster
968, 948	ν(C-O-C) éster
900, 850	δ(C-H) vinilideno
750	δ(N-H) fuera del plano amida II
690	δ(O-H)

Tabla 11. Modos vibracionales del copolímero pHEMA-g-colágeno 10/3g.

Al analizar comparar el espectro de infrarrojo del pHEMA-g-colágeno con el pHEMA (Figura 66) puede observarse que la posición de las bandas es muy similar a la del espectro de infrarrojo del pHEMA, pero se puede notar un ensanchamiento en la banda del carbonilo (C=O) correspondiente al grupo éster del pHEMA, este ensanchamiento coincide con el carbonilo (C=O) de la amida II del colágeno, también se observa un incremento en las banda de deformación del (-OH) en 690 cm^{-1} y la aparición de un hombro alrededor de 2675 cm^{-1} correspondiente al enlace saturado de $\text{N}-(\text{CH}_3)_2$, estos cambios pueden ser ocasionados por el injerto del HEMA en el colágeno formando enlaces que coinciden con algunos de los que se observaron inicialmente en el espectro del pHEMA. En las Figuras 67 y 68 se muestra la comparación de los espectros de infrarrojo del colágeno, el pHEMA y el copolímero pHEMA-g-Colágeno 10/3g en donde se observa principalmente la desaparición del enlace (N-H) en 1633 cm^{-1} y (C=O) en 1744 cm^{-1} del colágeno por lo que es probable que es donde se esté llevando a cabo el injerto. En las Figuras 69 y 70 se realiza la comparación de los espectros de infrarrojo de los copolímeros obtenidos a diversas relaciones en peso pHEMA/Colágeno, en los cuales las diferencias no son muy significativas, sin embargo físicamente se observo que el colágeno a mayor concentración tendía a migrar y no injertarse por completo posiblemente debido a la estereoquímica de las moléculas o del tamaño de las cadenas.

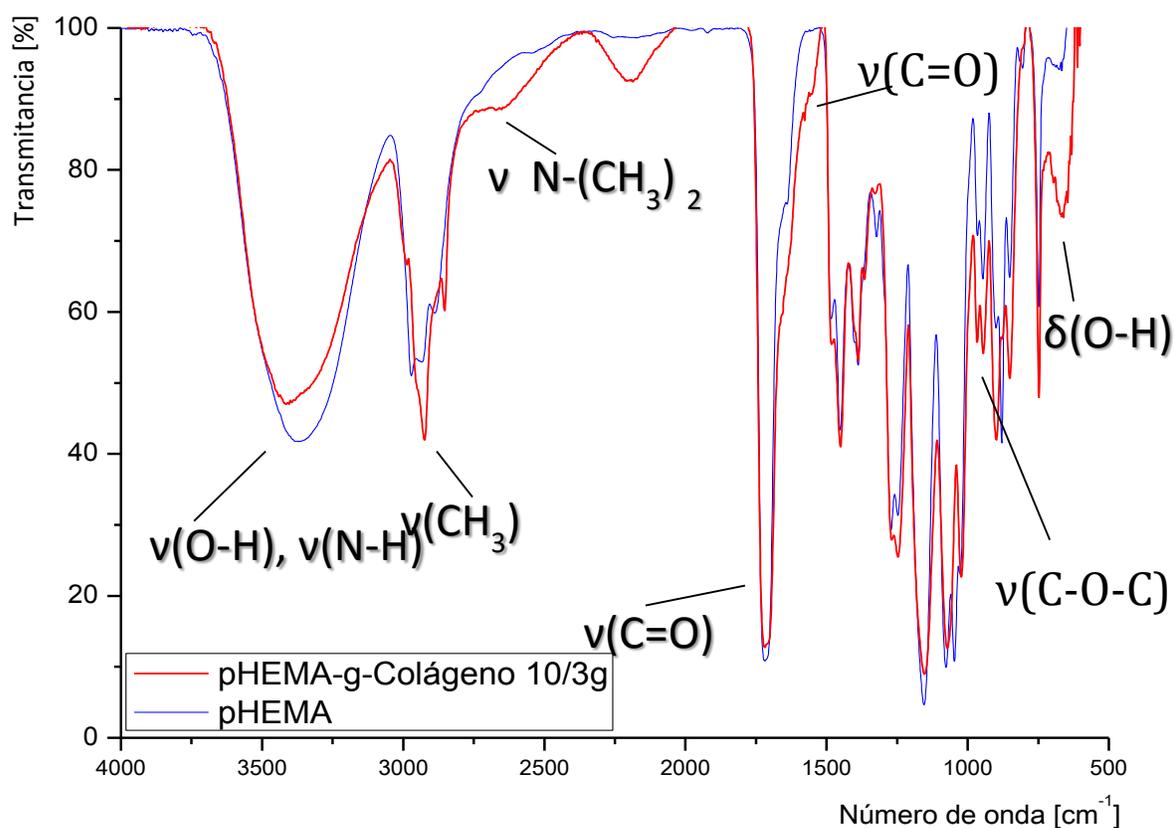


Figura 66. Espectro de infrarrojo comparativo entre el pHEMA y pHEMA-g-Colágeno 10/3g.

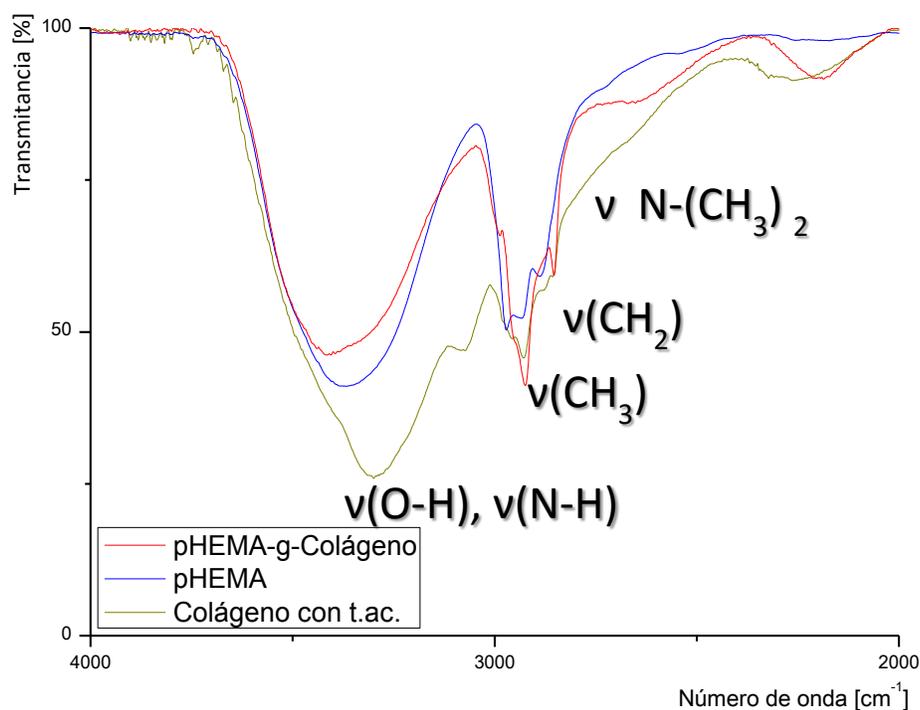


Figura 67. Espectro de infrarrojo comparativo del colágeno, pHEMA y copolímero pHEMA-g-colágeno sección 1.

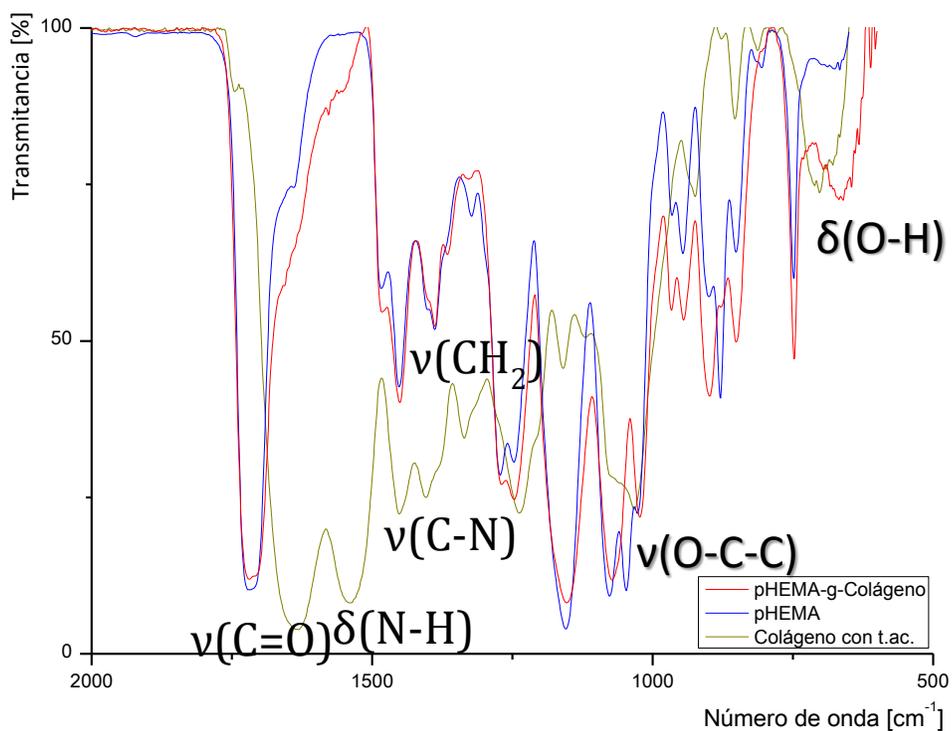


Figura 68. Espectro de infrarrojo comparativo del colágeno, pHEMA y copolímero pHEMA-g-colágeno sección 2.

Propuesta de la estructura del copolímero de injerto.

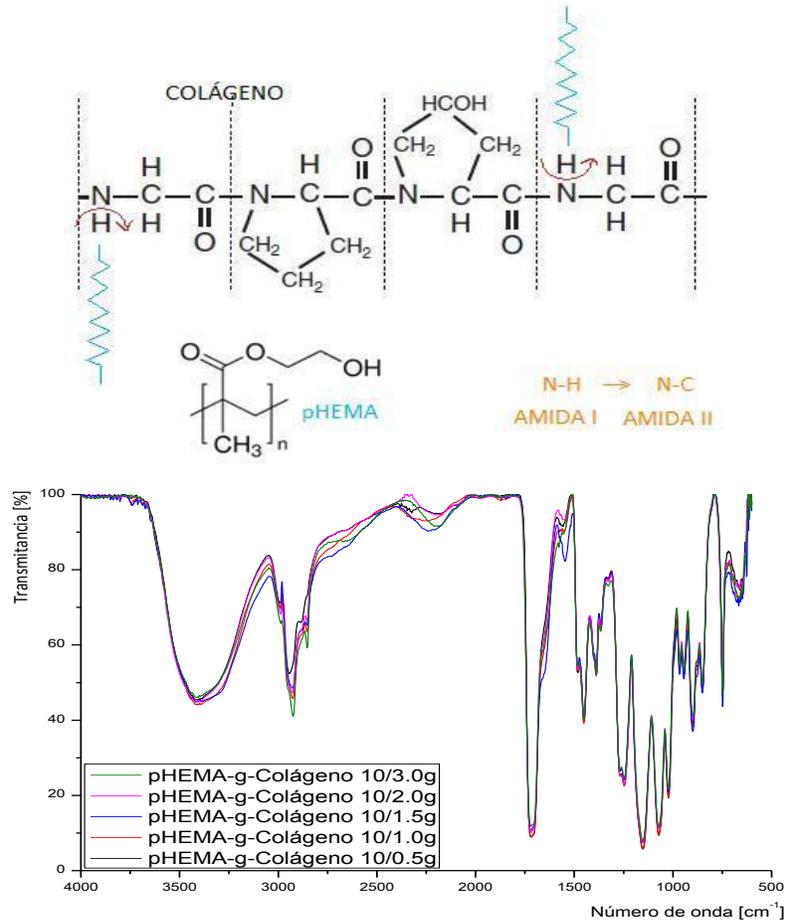


Figura 69. Espectros comparativos de los copolímeros pHEMA-g-Colágeno.

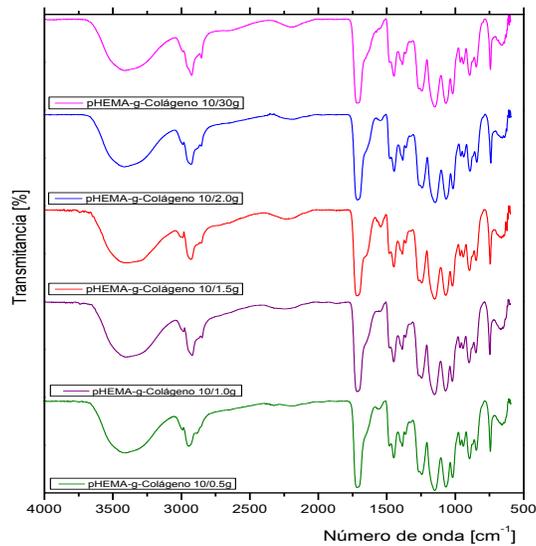


Figura 70. Espectros comparativos de los copolímeros pHEMA-g-Colágeno.

7.4 Análisis Termogravimétrico (TGA).

Al injertar un polímero sintético en un polímero natural la estabilidad térmica del polímero natural mejora. Si observamos los termogramas (Figura 71) y derivatogramas (Figura 72) del colágeno y del pHEMA, podemos ver que el injerto del pHEMA provocó un aumento en la estabilidad térmica del colágeno.

El termograma y derivatograma (Figuras 71, 71 y 73) muestran la liofilización y descomposición tanto del colágeno como del pHEMA y del copolímero de injerto pHEMA-g-colágeno, en donde puede observarse que el colágeno sufre una primera etapa de degradación que va de entre 50°C a 150°C la cual puede ser atribuida al agua absorbida, en esta etapa pierde el 5% de su peso, posteriormente sufre un segundo estado de degradación que va de 200°C a 250°C la cual puede atribuirse a la liberación de los puentes de hidrogeno de la proteína perdiendo 10% de su peso y finalmente sufre una descomposición la cual comienza en 250°C y termina en 450°C perdiendo un 80% del peso. El termograma y derivatograma para el pHEMA muestran dos cambios, en donde puede atribuirse el primero a la pérdida del agua absorbida ya que va de 50°C a 200°C entendiéndose que el pHEMA por ser un hidrogel absorbe una gran cantidad de agua, en esta etapa pierde alrededor del 8% de su peso y en la segunda etapa comienza su descomposición, la cual se lleva a cabo de 280°C a 440°C y pierde hasta un 90% de su peso al descomponerse. (Tabla 12)

Al analizar el comportamiento térmico de cada uno de los copolímeros pHEMA-g-colágeno en el termograma y el derivatograma (Figuras 71, 71 y 73), se puede observar la aparición de tres picos que pueden asignarse al igual que el colágeno a la liofilización o pérdida del agua absorbida en la primera etapa y la degradación o debilitamiento de los puentes de hidrogeno en el material en la segunda etapa y finalmente el tercer pico o etapa, se puede atribuir a la temperatura de descomposición del material. Pero es notable que en los copolímeros existe un corrimiento con respecto a los materiales iniciales (colágeno y pHEMA) elevando la temperatura de alrededor de 450°C con una pérdida de peso del 90%, es decir, casi 100°C más que la temperatura de descomposición del pHEMA. Esto puede ser atribuido a un nuevo arreglo estructural ocasionado por el injerto del pHEMA en la estructura del colágeno. Con respecto al aumento en base al aumento a la relación en peso HEMA/Colágeno no se encontró un patrón ordenado. Se demostró por lo tanto que se llevó a cabo el injerto, justificando que el comportamiento térmico cambió en el copolímero al modificarse la temperatura de descomposición del pHEMA y del colágeno en comparación con la temperatura de descomposición del copolímero pHEMA-g-colágeno.

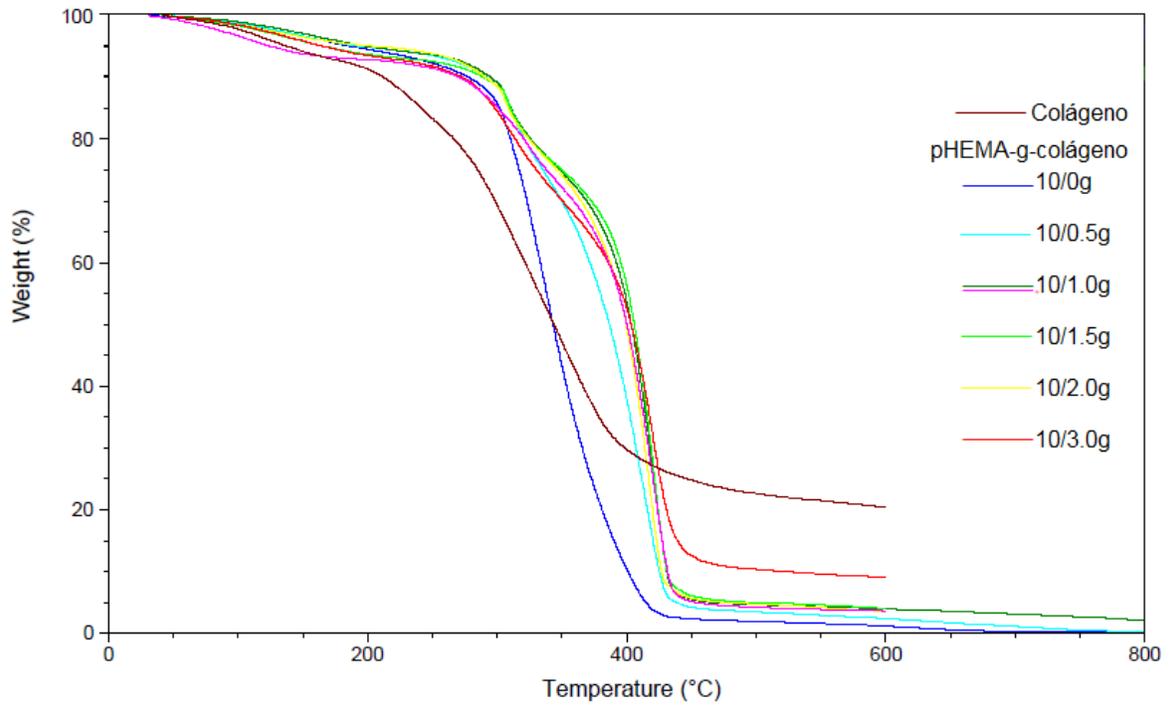


Figura 71. Termograma del pHEMA, colágeno y copolímeros pHEMA-g-colágeno.

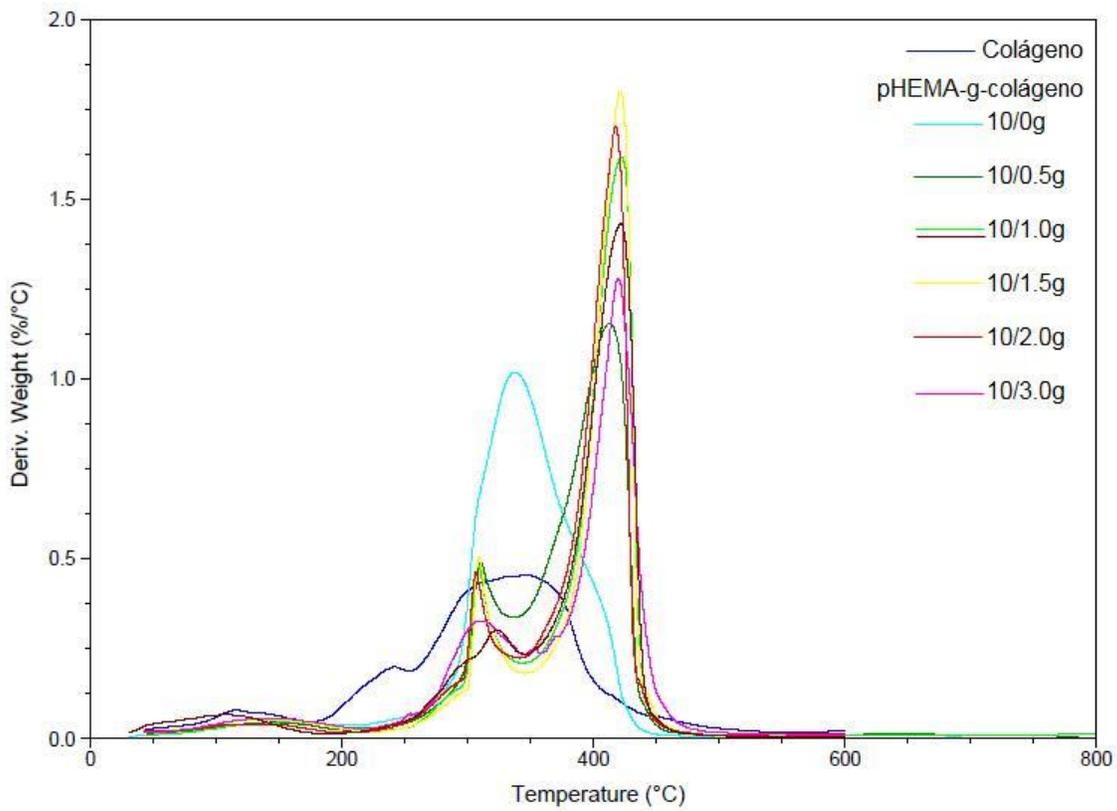


Figura 72. Derivatograma del pHEMA, colágeno y copolímeros pHEMA-g-colágeno.

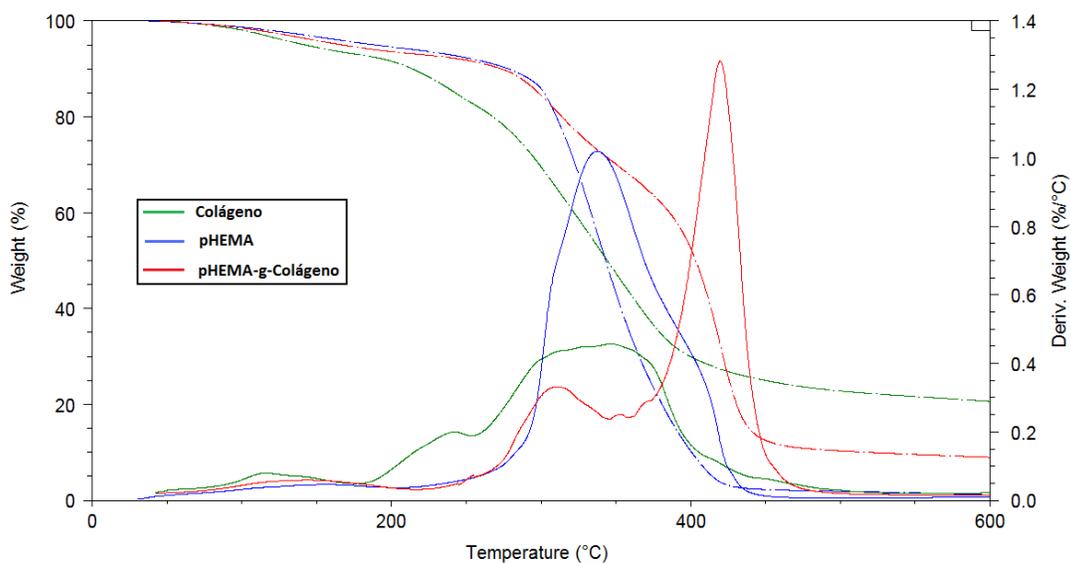


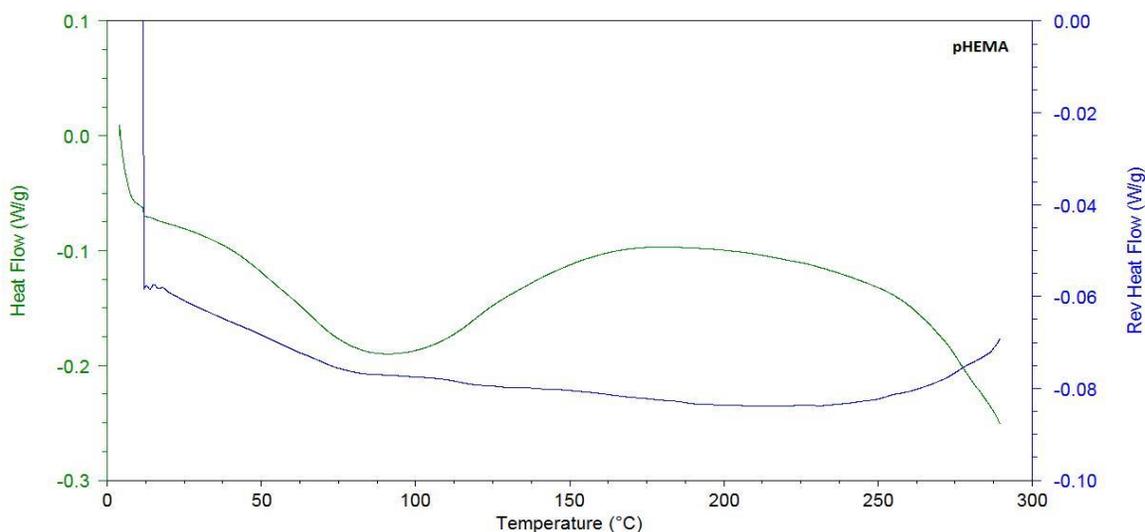
Figura 73. Termograma y derivatograma de los materiales.

Muestra	Temp.1	Temp.2	Temp. Descomp.
Colágeno	115°C (4%)	240°C (15%)	344°C (51%)
pHEMA	155°C (4%)	.	337°C (44%)
pHEMA-g-colágeno	157°C (4%)	308°C (15%)	421°C (76%)

Tabla 12. Temperaturas de descomposición y pérdida de peso de los materiales.

7.5 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

Con esta técnica se determinaron las transiciones térmicas del colágeno, pHEMA y los copolímeros pHEMA-g-colágeno tal como la temperatura de transición vítrea. En los termogramas [Figura 74](#), [75](#) y [76](#) se muestra la comparación entre cada uno de los compuestos. Puede observarse la presencia de un pico endotérmico para el colágeno alrededor de 100°C, para el pHEMA de 90°C y para los copolímeros pHEMA-g-colágeno en 120°C, estos los podemos relacionar con la temperatura de transición vítrea de cada compuesto, observando que existe un corrimiento el cual es posible que sea debido al nuevo arreglo estructural del material por el injerto del pHEMA en el colágeno ([Figura 77](#)). También se observan algunos picos exotérmicos en el termograma el termograma, sin embargo no existe un patrón definido en la aparición de estos con respecto a la concentración de colágeno en el copolímero, pero pueden ser relacionados con la pérdida de agua absorbida en el material al sintetizarlo o bien con la temperatura de descomposición del colágeno que no alcanzó a ser injertado, de modo que puede atribuirse esta competencia en las propiedades térmicas con el material no injertado y el injertado.



[Figura 74](#). Termograma DSC del colágeno.

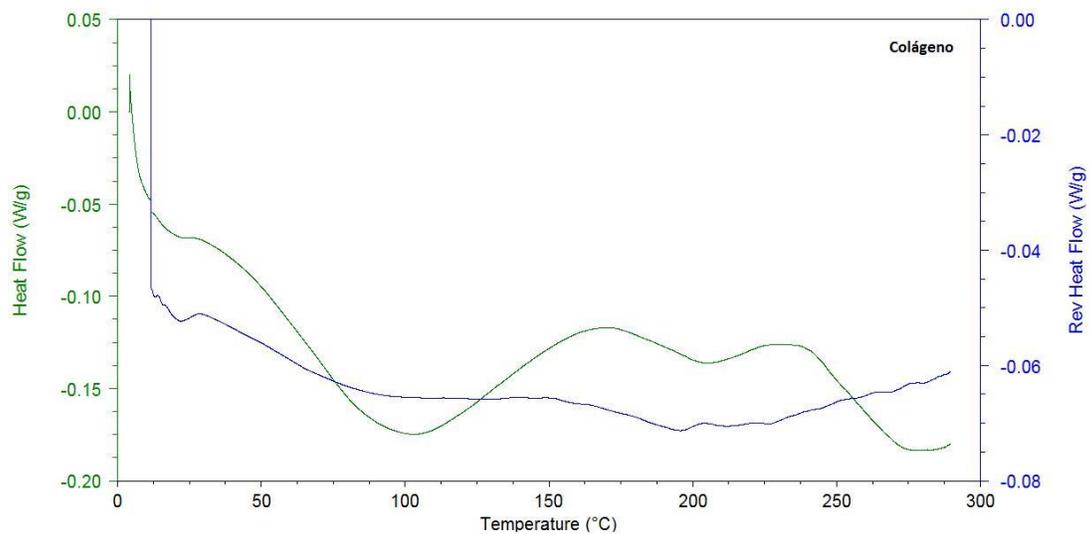


Figura 75. Termograma DSC del pHEMA.

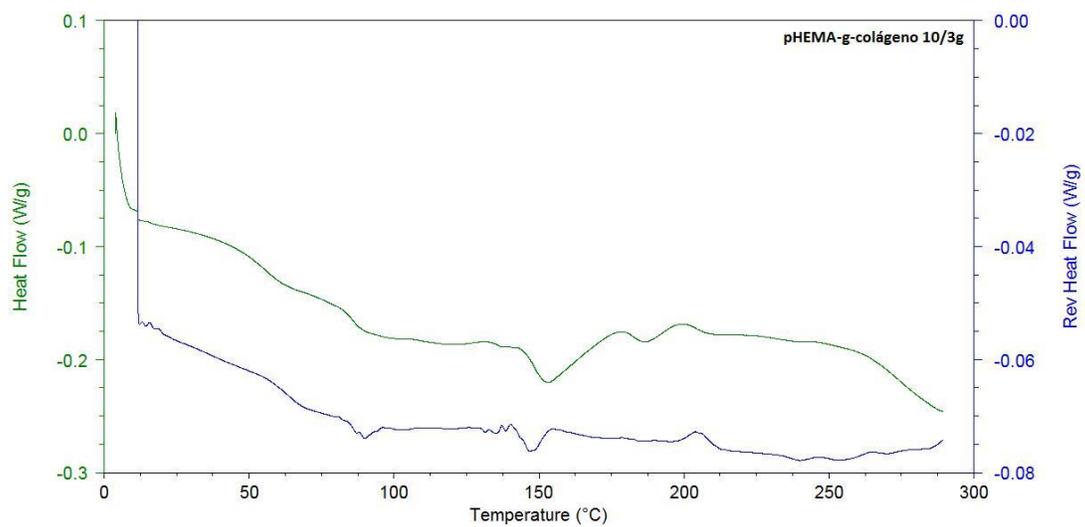


Figura 76. Termograma DSC del pHEMA-g-Colágeno.

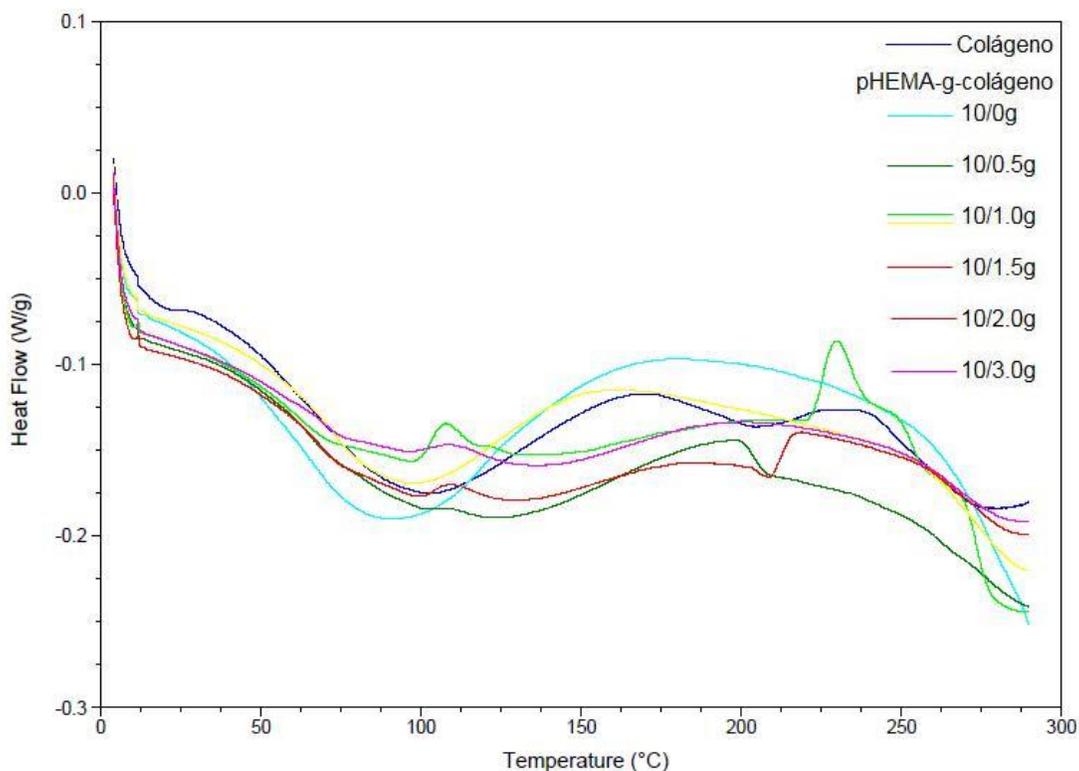


Figura 77. Termograma comparativo (DSC) del pHEMA, colágeno y copolímeros pHEMA-g-colágeno.

7.6 Ensayo de compresión.

Se realizaron dos pruebas de compresión para cada compuesto (confinada y sin confinar), en cada una de estas se procedió a deformar el material en un 50%, para los ensayos de compresión confinados se observaron las curvas características al módulo de elasticidad hasta llegar al punto donde el material no pudo ser comprimido más por el espaciamiento entre el contenedor y el punzón del equipo por lo que el compuesto analizado comenzó escapar del contenedor y se registraron variaciones no representativas en las gráficas (Figuras 78 a la 82). La presión soportada por el material fue decreciendo con respecto al aumento de concentración de colágeno como se muestra en las Tablas 13 y 14, esto es entendible en relación a que el colágeno lo que proporciona es elasticidad al material y no resistencia a la compresión.

El módulo de elasticidad entonces fue en aumento con respecto al contenido de colágeno en cada compuesto debido a las propiedades mecánicas otorgadas por el colágeno al pHEMA en el copolímero pHEMA-g-colágeno. Finalmente en la **Figura 82**, se muestra la curva comparativa de todos los compuestos sometidos al ensayo de compresión no confinada, en donde se observa de igual manera lo mencionado anteriormente aunque en este caso el esfuerzo soportado es distinto ya que no es detenido el compuesto en forma axial por el contenedor metálico.

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon} = \frac{F/S}{\Delta L/L}$$

Donde:

E es el módulo de elasticidad longitudinal.
 σ es la presión ejercida sobre el área de sección transversal del objeto.
 ϵ es la deformación unitaria en cualquier punto de la barra.

La ecuación anterior se puede expresar también como:

Muestra (confinada)	Módulo de Young [Mpa]
pHEMA	866
pHEMA-g-Colágeno 10/0.5g	795
pHEMA-g-Colágeno 10/1.0g	794
pHEMA-g-Colágeno 10/1.5g	763

Tabla 13. Módulo de young calculado para el ensayo de compresión confinada

Muestra (no confinada)	Módulo de Young [Mpa]	Resistencia a la compresión [Mpa]	% Deformación
pHEMA	5.7	3.7	50
pHEMA-g-Colágeno 10/0.5g	5.2	3.4	50
pHEMA-g-Colágeno 10/1.0g	5.1	3.3	50
pHEMA-g-Colágeno 10/1.5g	4.4	2.4	50

Tabla 14. Módulo de young calculado para el ensayo de compresión no confinada

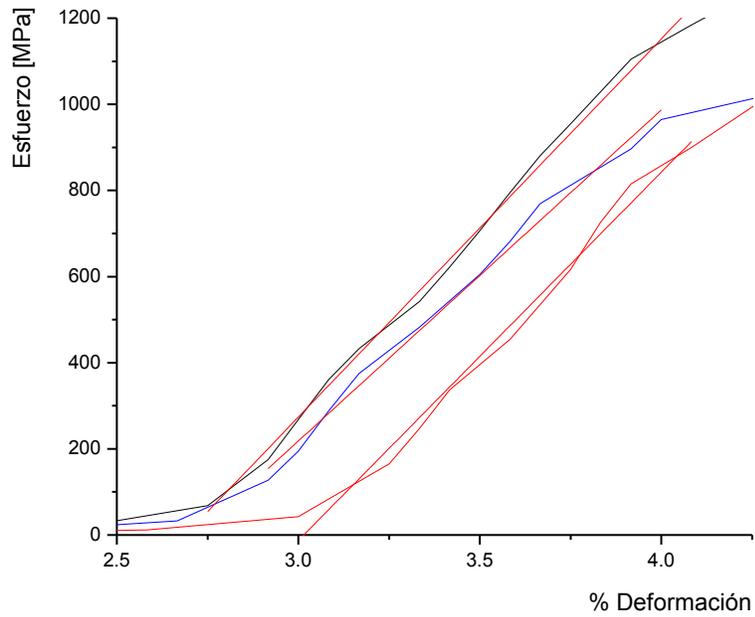


Figura 78. Ensayo de compresión confinada del pHEMA puro.

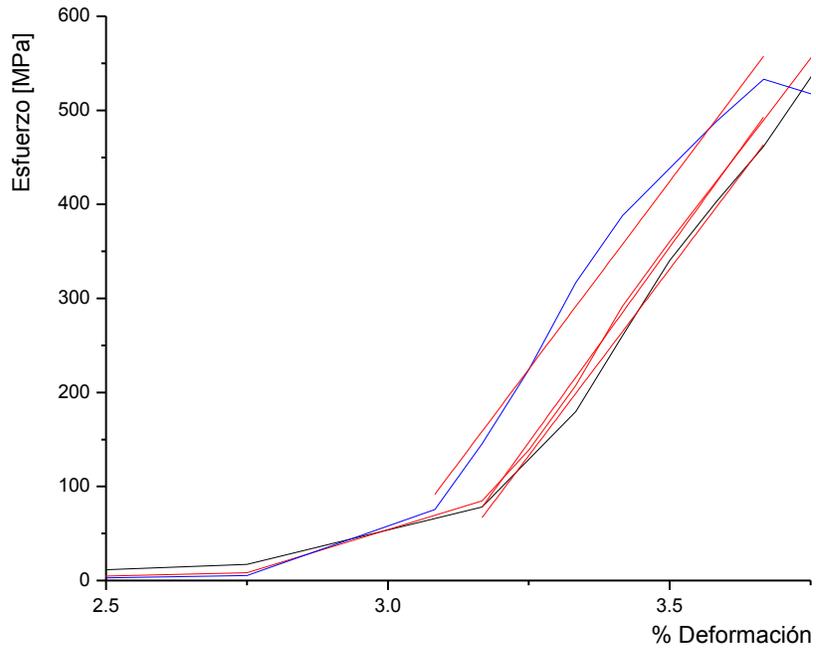


Figura 79. Ensayo de compresión confinada del pHEMA-g-colágeno 10g/0.5g.

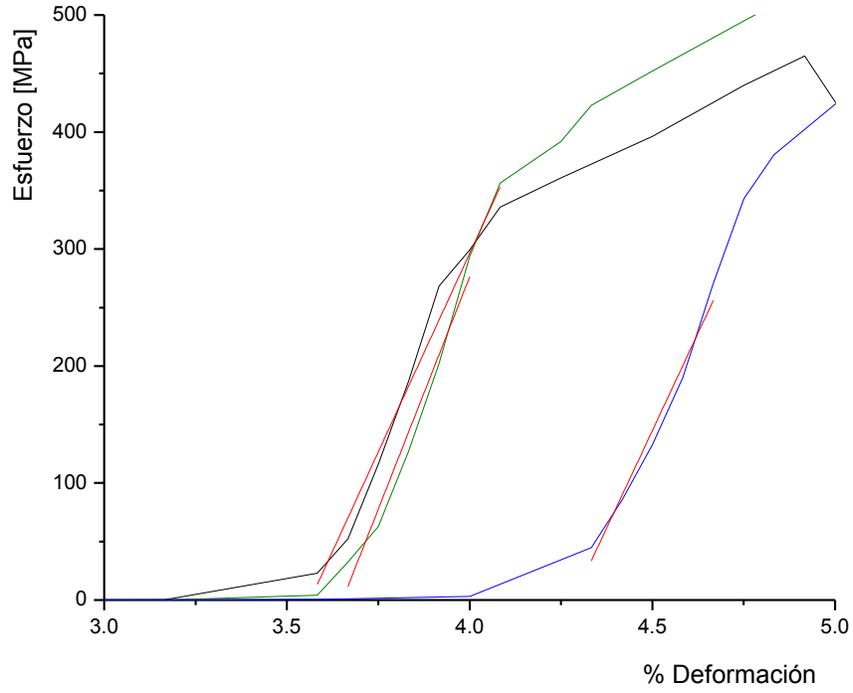


Figura 80. Ensayo de compresión confinada del pHEMA-g-colágeno 10g/1.0g.

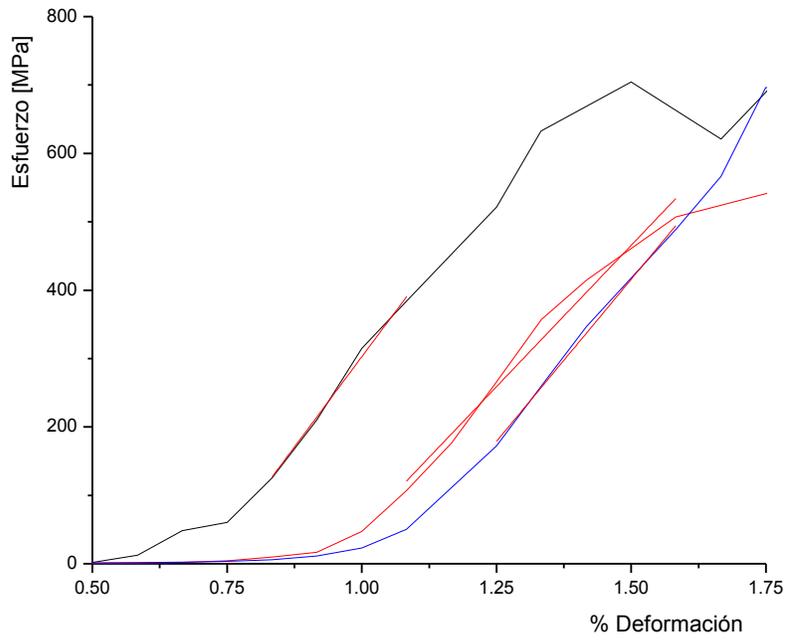


Figura 81. Ensayo de compresión confinada del pHEMA-g-colágeno 10g/1.5g.

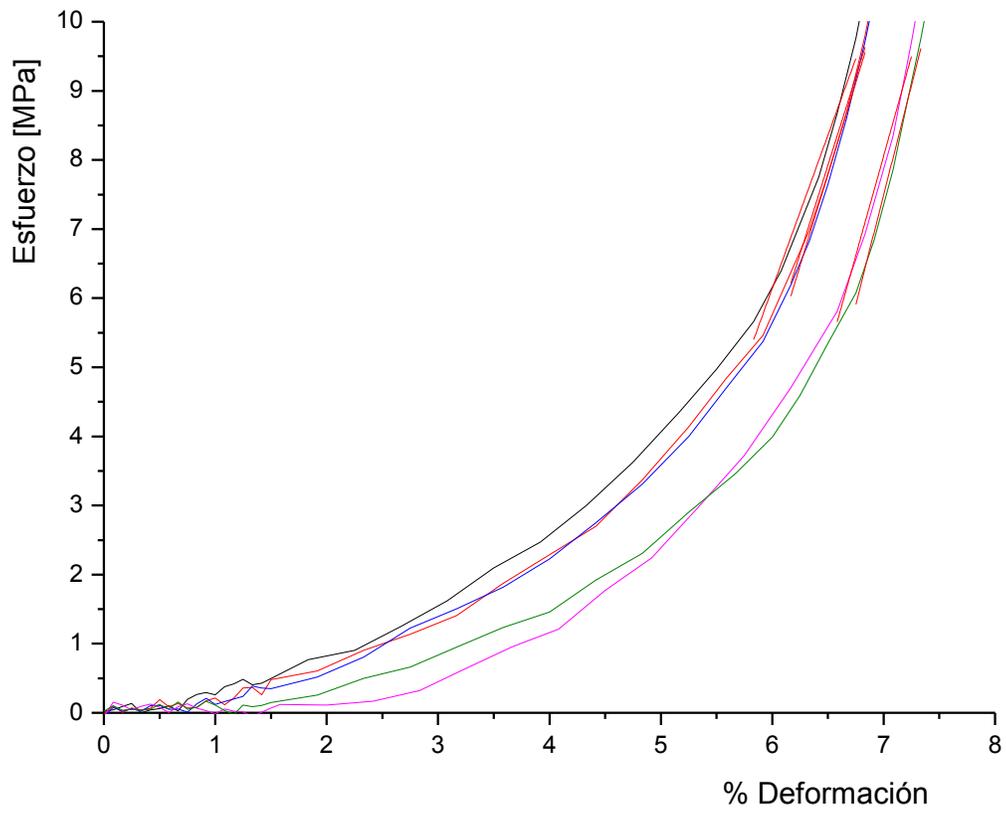


Figura 82. Ensayo de compresión no confinado comparativo entre los copolímeros pHEMA-g-colágeno 10/0, 10/0.5, 10/1.0g, 10/1.5g, 10/2.0.

CAPÍTULO 4

8 CONCLUSIONES

- ✚ Se logró sintetizar el copolímero de injerto pHEMA-g-colágeno a partir de colágeno y del 2-Hidroxietilmetacrilato (HEMA) por polimerización vía radicales libres.
- ✚ Se desarrollo un método de extracción de colágeno de las orejas de cerdo a partir de las referencias citadas, en donde se identificó al colágeno por medio del peso molecular mediante la técnica de SDS-PAGE.
- ✚ Se demostró que el pHEMA se injerta al colágeno por medio de la espectroscopia de infrarrojo, en donde existe una ruptura de enlace N-H y se genera un enlace C-N correspondiente al injerto pHEMA-g-colágeno. Por medio del análisis termogravimétrico TGA y calorimetría diferencial de barrido DSC se demostró de igual modo que existe la presencia de un injerto entre el pHEMA y el colágeno ya que se presenta un corrimiento de las temperaturas de transición vítrea y de descomposición del pHEMA-g-colágeno respecto a sus componentes por separado.
- ✚ A través de la microscopia electrónica de barrido se observó la morfología del polímero, en donde se encontró que esta presenta una superficie irregular, en base a la bibliografía se sabe que parte del colágeno en el material es absorbido al ser implantado en el cuerpo, pero reconociéndolo como parte de sí mismo y ayudando a la regeneración.
- ✚ Mediante el ensayo mecánico de compresión se encontró que el colágeno aporta elasticidad al copolímero de injerto pero a su vez reduce la resistencia al esfuerzo de compresión que puede soportar este a medida que se incrementa la concentración de colágeno en el copolímero.

- ✚ En base a la caracterización realizada de los copolímeros obtenidos, es posible que pueda ser utilizado como sustituto de cartílago humano sabiendo de antemano de la biocompatibilidad y permeabilidad de los materiales que lo integran, pero queda pendiente realizar pruebas in vitro e in vivo, así como también realizar la comparación con cada uno de los cartílagos que integran al cuerpo humano.

9 PERSPECTIVA

Este trabajo puede ser dirigido a realizar pruebas in vitro e in vivo para crear sistemas de cultivo celular, crecimiento de tejido, sistemas de liberación de proteínas, sistemas de liberación de fármacos, implantes para regeneración cartilaginosa, muscular u ósea con el copolímero pHEMA-g-colágeno debido a las ventajas que presenta como biopolímero respecto a sus propiedades mecánicas y su biocompatibilidad, anteriormente esto ha sido realizado con compuestos entre el pHEMA y el colágeno, pero en este caso sería motivo de estudio analizar la duración del biopolímero al ser implantado en el cuerpo ya que a diferencia de los anteriores se presenta como un copolímero de injerto.

También puede ser enfocado este trabajo para el desarrollo de una mejora en la metodología experimental, dado que solo se logro sintetizar hasta el injerto pHEMA-g-colágeno 10g/3g ya que el colágeno comenzaba a migrar del material por lo que sería conveniente y motivo de estudio el realizar la polimerización con el uso de aditivos.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Adam C. Aufderheide and Kyriacos A. Athanasiou. A Direct Compression Stimulator for Articular Cartilage and Meniscal Explants. *Annals of Biomedical Engineering*, 2006, 34, 1463–1474.
- [2] Sanjiv Bhatia, Peter R. Bergethon, Susan Blease, Thomas Kemper, Arthur Rosiello, Guy Zimbardi, Carl Franblau and Edward Spatz. A synthetic dural prosthesis constructed from hydroxyethylmethacrylate hydrogels. *J Neurosurg* 83, 897–902, 1995.
- [3] Masanori Kobayashi, Yong-Shun Chang, Masanori Oka. A two year in vivo study of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H) artificial meniscus. *Biomaterials*, 2005, 26, 3243–3248.
- [4] J. de Groot. Actifit, Polyurethane Meniscus Implant: Basic Science. *The Meniscus*, 2010, 10, 383-396.
- [5] R. Kang, C. Lattermann, B. Cole. Allograft meniscus transplantation. *J. Knee Surg.*, 2006, 19, 220-230.
- [6] Botella, M. C., & Cortés, M. A. P. Anatomía descriptiva meniscal de la rodilla mediante el estudio con resonancia magnética. *Revista de fisioterapia*, 2004, 3, 31-36.
- [7] Mocan, E., Tagadiuc, O., and Nacu, V. Aspects of collagen isolation procedure. *Clin. Res. Studies*, 2011, 2-6.
- [8] F.S. Senatov, M.V. Gorshenko, S.D. Kaloshkin, V.V. Tcherdyntsev, N.Yu. Anisimova, A.N. Kopylov, M.V. Kiselevsky Biocompatible polymer composites based on ultrahigh molecular weight polyethylene perspective for cartilage defects replacement. *Journal of Alloys and Compounds*, 2012, xxx.
- [9] A.G.A. Coombesa, E. Verderio, B. Shaw, X. Li, M. Griffin, S. Downes. Biocomposites of non-crosslinked natural and synthetic polymers. *Biomaterials*, 2002, 23, 2113–2118.
- [10] Sumito Kawamura, Kristin Lotito and Scott A. Rodeo. Biomechanics and healing response of the meniscus. *Operative Techniques in Sports Medicine*, 2003, 11, 68-76.
- [11] Mansour Joseph. *The Mechanics and Pathomechanics of Human Movement. Biomechanics of cartilage*, 2003. 66-79.
- [12] Xin L. Lu and Van C. MOW *Biomechanics of Articular Cartilage and Determination of Material Properties. Med. Sci. Sports Exerc.*, 2008, 40, 193–199.
- [13] Ian D. McDermott, Spyridon D. Masouros, Andrew A. Amis. *Biomechanics of the menisci of the knee. Current Orthopaedics*, 2008, 22, 193-201.
- [14] Chi H. Lee, Anuj Singla, Yugyung Lee. *Biomedical applications of collagen. International Journal of Pharmaceutics* 2011, 221, 1–22.
- [15] Torrez, J.C., Olave, M. C., Torrez, H. F. & Olave, E. *Biometric Characteristics of Knee Meniscus in Chilean Individuals. Int. J. Morphol.*, 2011, 29, 1007-1011.
- [16] Seonghun Park, Steven Nicoll, Robert Maluck and Gerard Ateshian. *Cartilage Mechanical Response under Dynamic Compression at Physiological Stress Levels Following Collagenase Digestion. Annals of Biomedical Engineering*, 2004, 36, 425–434.

- [17] Y. Katsuragawa, K. Saitoh, N. Tanaka, M. Wake, Y. Ikeda, H. Furukawa, S. Tohma, M. Sawabe, M. Ishiyama, S. Yagishita, R. Suzuki, H. Mitomi, N. Fukui. Changes of human menisci in osteoarthritic knee joints. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2010, 18, 1133-1143.
- [18] J.H. Muyong, C.G.B. Cole, K.G. Duodu. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, 2004, 85, 81–89.
- [19] Xiu-Rong Su, Bei Sun, Yan-Yan Li, Qiu-Hui Hu. Characterization of acid-soluble collagen from the coelomic wall of Sipunculida. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23, 2190–2194.
- [20] M. Yan, B. Li, X. Zhao, G. Ren, Y. Zhuang, Hu Hou, X. Zhang, Li Chen, Yan Fan. Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). *Food Chemistry*, 2008, 107, 1581–1586.
- [21] R. Jeyanthi and K. Panduranga. Collagen-Poly(HEMA) Hydrogels for the Controlled Release of Anticancer Drugs Preparation and Characterization. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 1990, 5: 194-211.
- [22] K. Gelse, E. Poschl, T. Aignera. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, 55, 1531– 1546.
- [23] William G. Rodkey, Kenneth E. DeHaven, William H. Montgomery. Comparison of the Collagen Meniscus Implant with Partial Meniscectomy. A Prospective Randomized Trial. *J Bone Joint Surg Am*, 2008, 90, 1413-1426.
- [24] Douglas R. Lloyd and Charles M. Burns. Coupling of Acrylic Polymers and Collagen by Use of a Water-Soluble Carbodiimide. 11. Investigations of the Coupling Mechanism. *Journal of Polymer Science*, 1979, 17, 3473-3483.
- [25] J.S. Pieper, P.M. van der Kraan, T. Hafmans, J. Kamp, P. Buma, J.L.C. van Susante, W.B. van den Berg, J.H. Veerkamp, T.H. van Kuppevelt. Crosslinked type II collagen matrices: preparation, characterization, and potential for cartilage engineering. *Biomaterials*, 2002, 23, 3183–3192.
- [26] Adolfo Sebastián Maiolo, Matías Nicolás Amado, Jimena Soledad Gonzalez, Vera Alejandra Alvarez. Development and characterization of Poly (vinyl alcohol) based hydrogels for potential use as an articular cartilage replacement. *Materials Science and Engineering*, 2012, 32, 1490–1495.
- [27] Masanori Kobayashi, Jyunya Toguchida, Masanori Oka. Development of an artificial meniscus using polyvinyl alcohol-hydrogel for early return to, and continuance of, athletic life in sportspersons with severe meniscus injury. I: mechanical evaluation. *The Knee*, 2003, 10, 47–51.
- [28] Shangmuganathan, Adhirajan, Ramyaa, Babu. Design of shark skin collagen-aloe composite scaffold for tissue engineering. *Ars Pharm.*, 2008, 49, 321-340.
- [29] Jeffrey J. Ballyns, Lawrence, J. Bonassar. Dynamic compressive loading of image-guided tissue engineered meniscal constructs. *Journal of Biomechanics*, 2011, 44, 509–516.
- [30] M.W. Creaby, Y. Wangx, K.L. Bennell, R.S. Hinman, B.R. Metcalf, K.-A. Bowles, F.M. Cicuttini. Dynamic knee loading is related to cartilage defects and tibial plateau bone area in medial knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2010, 18, 1380-1385.
- [31] Keng-Liang Ou, Ren-Jei Chung, Fu-Yi Tsai, Pei-Yu Liang, Shih-Wei Huang, Shou-Yi. Effect of collagen on the mechanical properties of hydroxyapatite

- coatings. *Journal of the mechanical behavior of biomechanical materials*, 2011, 4, 618-624.
- [32] M. Falconi, G. Teti, M. Zago, S. Pelotti, L. Breschi and G. Mazzotti. Effects of HEMA on type I collagen protein in human gingival fibroblasts. *Cell Biol Toxicol* 2007, 23, 313–322.
- [33] M. Zago, G. Teti, G. Mazzotti, A. Ruggeri, L. Breschi, S. Pelotti, M. Ortolani, M. Falconi. Expression of procollagen a1 type I and tenascin proteins induced by HEMA in human pulp fibroblasts. *Toxicology in Vitro*, 2008, 22, 1153–1159.
- [34] Takashi Sato, Guoping Chen, Takashi Ushidada, Tomoo Ishii, Naoyuki Ochiai, Tetsuya Tateishi, Junzo Tanaka. Evaluation of PLLA–collagen hybrid sponge as a scaffold for cartilage tissue engineering. *Materials Science and Engineering*, 2004, 24, 365–372.
- [35] S. Cliche, J. Amiot,† C. Avezard and C. Gariepy. Extraction and Characterization of Collagen with or Without Teloepitides from Chicken Skin. *Poultry Science Association*, 2003, 503-509.
- [36] Maria Helena Santos, Rafael M. Silva, Vitor C. Dumont, Juliana S. Neves, Herman S. Mansur, Luiz Guilherme D. Heneine. Extraction and characterization of highly purified collagen from bovine pericardium for potential bioengineering applications. *Materials Science and Engineering*, 2013, 33, 790–800.
- [37] Paolo Bulgheroni, Luigi Murena, Chiara Ratti, Erica Bulgheroni, Mario Ronga, Paolo Cherubino. Follow-up of collagen meniscus implant patients: Clinical, radiological, and magnetic resonance imaging results at 5 years. *The Knee*, 2010, 17, 224–229.
- [38] Mark E. Freeman, Michael J. Furey, Brian J. Love, Jeanne M. Hampton. Friction, wear, and lubrication of hydrogels as synthetic articular cartilage. *Wear* 241 2000. 129–135
- [39] Patrick Sharrock, Genevieve Gregoire. HEMA reactivity with demineralized dentin. *Journal of dentistry*, 2010, 38, 331 – 335.
- [40] M. Endres, K. Neumann, S.E.A. Schroder, S. Vetterlein, L. Morawietz, J. Ringe, M. Sittinger, C. Kaps. Human polymer-based cartilage grafts for the regeneration of articular cartilage defects. *Tissue and Cell*, 2007, 39, 293–301.
- [41] Jordi Bella, Barbara Brodsky and Helen M Berman. Hydration structure of a collagen peptide. *Structure*, 1995, 3, 893-906.
- [42] T.P. Sastry and K. Panduranga Rao. Hydrogels Based on Amniotic Collagen Poly(Hydroxyethyl Methacrylate) Graft Copolymers. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 1990, 5, 430-438.
- [43] Wicherle, O. and Lím, D. Hydrophilic gels for biological use, *Nature*, 1960, 185, 117-118.
- [44] K. Kejlova, J. Labsky, D. Jirova, H. Bendova. Hydrophilic polymers—biocompatibility testing in vitro. *Toxicology in Vitro*, 2005, 19, 957–962.
- [45] Jyoti K. Rao, D. Vijaya Ramesh and K. Panduranga Rao. Implantable delivery controlled systems for proteins based on collagen-pHEMA hydrogels. *Biomaterials*, 1995, 15, 383-389.
- [46] K. Smetana Jr., M. Stol, P. Korbelár, M. Novák and M. Adam. Implantation of p(HEMA)-collagen composite into bone. *Biomaterials*, 1992, 13, 639-642.

- [47] R. Jeyanthi and K. Panduranga Rao. In vivo biocompatibility of collagen poly(hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. *Biomaterials* 1990, 11, 238-243.
- [48] T. Shiomi, T. Nishii, S. Tamura, H. Tanaka, K. Murase, H. Yoshikawa, N. Sugano. Influence of medial meniscectomy on stress distribution of the femoral cartilage in porcine knees: a 3D reconstructed T2 mapping study. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2012, 20, 1383-1390.
- [49] L. McCann, E. Ingham, Z. Jin and J. Fisher. Influence of the meniscus on friction and degradation of cartilage in the natural knee joint. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2009, 17, 995-1000.
- [50] Lin Wang, Xinxin An, Fangmei Yang, Zhihong Xin, Liyan Zhao, Qihui Hu. Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). *Food Chemistry*, 2008, 108, 616–623.
- [51] L.S. Senaratne, Pyo-Jam Park, Se-Kwon Kim. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. *Bioresource Technology*, 2006, 97, 191–197.
- [52] Paul G. Scott, Takuo Nakano, Carole M. Dodd. Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, 1336, 254–262.
- [53] Yan Zhang, Wentao Liu, Guoying Li, Bi Shi, Yuqing Miao, Xiaohua Wu. Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Chemistry*, 2007, 103, 906–912.
- [54] Charles Clark and Charlotte Richards. Isolation and Partial Characterization of Precursors to Minor Cartilage Collagens. *Collagen Rel. Res.* 1985, 5, 205-223.
- [55] Phanat Kittiphattanabawon, Soottawat Benjakul. Isolation and properties of acid- and pepsin-soluble collagen from the skin of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). *Eur Food Res Technol*, 2010, 230, 475–483.
- [56] Thomas G. Koch, Lorenzo Moroni, Younes Leysi-Derilou and Lise C. Berg. Joint Cartilage Tissue Engineering and Pre-Clinical Safety and Efficacy Testing. *Tissue Engineering for Tissue and Organ Regeneration*, 2011, 10, 182-215.
- [57] Obeid, Adams, Newman. Mechanical properties of articular cartilage in knee with unicompartmental osteoarthritis. *J BoneJoint Surg*, 1994, 76, 315-319.
- [58] Albert C. Chen, Stephen M. Klisch, Won C. Bae, Michele M. Temple, Kevin B. McGowan, Kenneth R. Gratz, Barbara L. Schumacher, and Robert L. Sah Mechanical Characterization of Native and Tissue-Engineered Cartilage. *Methods in Molecular Medicine*, 101, 158-190.
- [59] Duda, Haisch, Endres, Gebert, Daniel Schroeder, Hoffmann, Sittinger, Mechanical Quality of Tissue Engineered Cartilage: Results after 6 and 12 Weeks In Vivo. 2000, 673-677.
- [60] J. Jancar, A. Slovikova, E. Amler, P. Krupa, H. Kecova, Mechanical Response of Porous Scaffolds for Cartilage Engineering. *Physiol. Res.*, 2007, 56 S17-S25.
- [61] L. Bostan, A.-M.Trunfio-Sfarghiu, L.Verestiuc, M.I.Popa, F.Munteanu, J.-P.Rieu, Y.Berthier. Mechanical and tribological properties of poly hydroxyethyl methacrylate Hydrogels as articular cartilage substitutes. *Tribology International*, 2012, 46, 215–224.

- [62] Geoffrey S. Van Thiel, Nikhil Verma, Adam Yanke, Sanjib Basu, Jack Farr, and Brian Cole. Meniscal Allograft Size Can Be Predicted by Height, Weight, and Gender. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, 2009, 25, 722-727.
- [63] J. Klompmaker, R.P.H. Veth, H.W.B. Jansen, H.K.L. Nielsen, J.H. de Groot and A.J. Pennings. Meniscal replacement using a porous polymer prosthesis: a preliminary study in the dog. *Biomaterials*, 1996, 17, 1169-1175.
- [64] Braz, PRP. and Silva, WG Meniscus morphometric study in humans. *J. Morphol. Sci.*, 2010, 27, 62-66.
- [65] Tony G. van Tienen, Gerjon Hannink, Pieter Buma. Meniscus Replacement Using Synthetic Materials. *Clin Sports Med*, 2009, 28 143–156.
- [66] Anik Chevrier, Monica Nelea, Mark B. Hurtig, Caroline D. Hoemann, Michael D. Buschmann Meniscus Structure in Human, Sheep, and Rabbit for Animal Models of Meniscus Repair. *Journal of orthopaedic research*, 2009, 1197-1203.
- [67] Sheena Abraham, Sean Brahim, Kazuhiko Ishihara, Anthony Guiseppi-Elie. Molecularly engineered p(HEMA)-based hydrogels for implant biochip biocompatibility. *Biomaterials*, 2005, 26, 4767–4778.
- [68] B. V. Murlimanju, Narga Nair, Shakuntala R. Pai, Mangala M. Pai, Chandni Gupta. Morphometric Analysis of the Menisci of the Knee Joint in South Indian Human Fetuses. *Int. J. Morphol.*, 2010, 28, 1167-1171.
- [69] S. Potorac, M. Popa, L. Verestiuc, D. Le Cerf. New semi-IPN scaffolds based on HEMA and collagen modified with itaconic anhydride. *Materials Letters*, 2012, 67 2012, 95–98.
- [70] J.M. Parraga Quiroga, C. C. van Donkelaar, K. Ito. Numerical design and development of a meniscus implant based on functionality and tissue damage. *Biomedical Engineering, Biomedical Engineering*, 2010.
- [71] W. A. Millano, Morales. Obtención, purificación y liofilización de colágeno. *Rev. Téc. log., Univ. Zulia*, 1989, 12.
- [72] Sandra Lee. Optimal Conditions for Long Term Storage of Native Collagens. *Collagen Rel. Res.* 1983, 3, 305-315.
- [73] M. Stol. Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)- Collagen Composites for Biomedical applications. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 1991, 6, 308-315.
- [74] Miroslav Stol and Karel Smetana, JR. Preparation of Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-Collagen Composites. *J. Biomater. Appl.*, 1993, 7: 224-232.
- [75] M. Stol, M. Tolart and M. Adam. Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)collagen composites which promote muscle cell differentiation in vitro. *Biomaterials*, 1985, 6, 193-197.
- [76] Hatice Bodugoz-Senturk, Celia E. Macias, Jean H. Kung, Orhun K. Muratoglu. Poly(vinyl alcohol)–acrylamide hydrogels as load-bearing cartilage substitute. *Biomaterials* 30 (2009) 589–596.