



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

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DE MEMBRANAS DE COLÁGENA TIPO I, A PARTIR DE LA DESMINERALIZACIÓN DE HUESO DE BOVINO DESCELURIZADO, PARA REGENERACIÓN CUTÁNEA

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:
FÍS. ANGELA MISCLI RANGEL GARCIA

TUTOR PRINCIPAL
DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES, UNAM

COMITÉ TUTOR
DRA. VERÓNICA GONZÁLEZ TORRES
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA, CAMPUS TIJUANA

DR. ALFREDO MACIEL CERDA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ENERO, 2021



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.

*A mi mamá,
Naye, Beto y
Nerón, son mi
coraje para
seguir.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicar las siguientes palabras a todas las personas que han contribuido a mi crecimiento como profesional y como persona, y que además han hecho posible la realización de éste trabajo.

Familia, su apoyo y aliento han sido los factores impulsores en mi vida. Gracias mami por ser mi heroína, darme tu amor, por formarme y convertirme en la persona que soy. A mi amiga de toda la vida, mi hermana Naye, gracias por tu amor, protección y apoyo que siempre nos ha unido. Betito, gracias por ayudarme a enfrentar mis miedos, por estar ahí, sobre todo cuando no te llamo, por motivarme a ser una mejor persona, a dar siempre lo mejor y más grande esfuerzo. Agradezco también al consentido de la casa por ser mi fuente de amor. No sería quien soy sin ustedes, gracias.

Mi más profundo agradecimiento, y admiración, a la Dra. María Cristina Piña Barba por darme la confianza desde el primer día en que fui a su cubículo, por compartirme su tiempo, conocimientos y gran experiencia. Por inspirarme con su ejemplo de pasión, profesionalismo y dedicación.

A mi comité tutor: Dra. Verónica González Torres y el Dr. Alfredo Maciel Cerda gracias a todas sus atenciones, aportaciones y conocimientos que enriquecieron éste trabajo.

Agradezco a la institución a la pertenecer es un orgullo: La UNAM.

A mis amigos de generación: Gerardo, gracias por las largas pláticas, increíbles consejos, la ayuda y todo el conocimiento e inspiración que me has transmitido. Geovanny por estar motivándome a trabajar, las pláticas amenas y las horas de estudio compartidas. Agradezco a los dos por estar ahí brindándome su gran amistad, su apoyo, por las buenas comidas, todas las risas y grandes momentos que hemos compartido.

Por las pláticas, la gran ayuda y conocimientos que me han aportado quiero agradecer a mis compañeros del Laboratorio de Biomateriales: Jimena, Tannia, Karen, Lorena, David, Juan Manuel y, con especial agradecimiento, a Isaac que fue un gran maestro en mis primeros pasos dentro del laboratorio. Al Dr. David y la Dra. Karla por transmitirme la pasión y profesionalismo con el que trabajan. De todos y cada uno de ustedes he aprendido tantas cosas del trabajo en el

laboratorio y en equipo.

A Concepción Castro y Julio Gutiérrez por sus consejos, pláticas y apoyo.

Agradezco la ayuda brindada por el Dr. Ignacio Alejandro Figueroa Vargas para cortar las muestras.

Por el apoyo técnico para la caracterización del material, agradezco a los técnicos: Ing. Carlos Flores Morales por el apoyo con las imágenes de Microscopia Electrónica de Barrido, al M.C Eliezer Hernández Mecinas por la ayuda en las pruebas mecánicas, a la Ing. Eriseth Reyes Morales por su apoyo en las pruebas térmicas y al Quím. Miguel Ángel Canseco Martínez por la ayuda en la espectroscopia infrarroja.

Quiero agradecer por todas sus observaciones y tiempo dedicado a mi trabajo al jurado que me fue asignado:

Presidente: Dr. Arturo Barba Pingarrón

Primer Vocal: Dra. María Cristina Piña Barba

Segundo Vocal: Dr. Miguel Angel Araiza Téllez

Tercer Vocal: Dra. Rosa María Quispe Siccha

Secretario: Dra. Karla Karina Gómez Lizárraga

Asimismo, agradezco al Instituto de Investigación en Materiales de la UNAM que, como estudiante asociada, me permitió disponer de sus servicios e instalaciones, de igual forma agradezco a todos mis profesores a lo largo de la maestría que contribuyeron en gran forma a mi formación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada de maestría.

Esta investigación fue realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IT 100719.

Quiero agradecer a la empresa BioCriss por la donación del material con el que se realizó este trabajo.

RESUMEN

Las heridas en la piel que por distintos factores no pueden llevar a cabo el proceso de curación de forma natural o forma cicatrices patológicas en las cuales se pierden las funciones de la piel, necesitan de diversos tratamientos para recuperar el órgano. Entre ellos se encuentran los distintos tipos de injertos de piel o la ingeniería de tejidos, a través de los andamios celulares, que pueden ser naturales o sintéticos, para la regeneración de tejidos. Dado que los injertos de piel no son una solución viable debido a sus altas tasas de rechazo y la escasez del tejido, los andamios celulares naturales o sintéticos son una solución potencial. Estos andamios están elaborados a partir de biomateriales naturales o sintéticos que promueven una repoblación de las células típicas de la piel y tienen como función la reparación y/o la regeneración del tejido dañado.

En este trabajo se buscó obtener un biomaterial capaz de promover la regeneración de piel en heridas en las cuales los tratamientos convencionales no funcionan, por ejemplo: heridas crónicas o de larga extensión. Se obtuvieron membranas de colágena tipo I, a partir de la desmineralización de hueso descelularizado (Nukbone®), que además, fueron recubiertas con una solución de quitosano, por sus propiedades antibacteriales, antimicrobianas, actividad hemostática, biodegradable y biocompatible. Las principales razones de obtener

las membranas a través de la desmineralización de material óseo, son que el hueso como la piel están conformados de colágena tipo I y además se quiso comprobar que el proceso de desmineralización no afecta la microarquitectura de la matriz extracelular del hueso, y de esta forma verificar, a partir de las propiedades físico-químicas de las membranas, si son viables para una posible regeneración de tejido cutáneo.

A lo largo de este trabajo las propiedades de estudio que se evaluaron fueron: morfología superficial (microscopía electrónica de barrido, por sus siglas en inglés *Scanning Electron Microscope*, SEM) de las membranas de colágena tipo I recubiertas con quitosano para verificar el estado de la microestructura y la composición elemental de la superficie (por sus siglas en inglés *Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*, EDS), el comportamiento térmico a través del estudio de análisis termogravimétrico (por sus siglas en inglés *Thermal Gravimetric Analysis* TGA) , esta técnica se usó para determinar la estabilidad térmica del andamio mediante la medición de pérdida del porcentaje de pérdida de peso, y calorimetría diferencial de barrido (por sus siglas en inglés *Differential Scanning Calorimetry*, DSC), para observar las transiciones de térmicas presentes en las muestras de estudio. Asimismo, se estudió la composición química de las membranas con espectroscopía infrarroja (por sus siglas en inglés *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR) para comprobar la presencia de las bandas características de la colágena y quitosano. También se realizó un estudio de pruebas mecánicas I para evaluar la respuesta de las membranas a la tensión.

Los resultados mostraron que se obtuvieron membranas, de origen xenogénico, con características físicas, químicas y mecánicas que las hacen buenas candidatas para aplicaciones en heridas en piel, por lo que sugieren que es un material con potencial para continuar siendo investigado, de forma biológica, para ser usado como posible sustituto en heridas en piel.

ABSTRACT

Wounds on the skin that, due to different factors, cannot carry out the healing process naturally or form pathological scars in which the functions of the skin are lost, need various treatments to recover the organ. Among them are the different types of skin grafts or tissue engineering, through cell scaffolds, which can be natural or synthetic, for tissue regeneration. Since skin grafts are not a viable solution due to their high rejection rates and scarcity of tissue, natural or synthetic cell scaffolds are a potential solution. These scaffolds are made from natural or synthetic biomaterials that promote repopulation of typical skin cells and have the function of repairing and / or regenerating damaged tissue. This work sought to obtain a biomaterial capable of promoting skin regeneration in wounds in which conventional treatments do not work, for example: chronic or long-term wounds. Type I collagen membranes were obtained from the demineralization of decellularized bone (Nukbone®), which were also coated with a chitosan solution, due to its antibacterial, antimicrobial, hemostatic, biodegradable and biocompatible activity. The main reasons for obtaining the membranes through the demineralization of bone material are that bone and skin are made up of type I collagen and it was also wanted to verify that the demineralization process does not affect the microarchitecture of the extracellular matrix of the bone. and in this way to verify, based on the physicochemical properties of the membranes, if they are viable for a possible regeneration of skin tissue. Throughout this work, the

study properties that were evaluated were: surface morphology (Scanning Electron Microscope, SEM) of type I collagen membranes coated with chitosan to verify the state of the microstructure and elemental composition of the surface (for its acronym in English Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy, EDS), the thermal behavior through the study of thermogravimetric analysis (for its acronym in English Thermal Gravimetric Analysis TGA), this technique was used to determine the thermal stability of the scaffold by measuring the loss of the percentage of weight loss, and Differential Scanning Calorimetry (DSC), to observe the thermal transitions present in the study samples. Likewise, the chemical composition of the membranes was studied with infrared spectroscopy (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) to verify the presence of the characteristic bands of collagen and chitosan. A mechanical test study was also conducted to evaluate the membranes' stress response.

The results showed that membranes of xenogenic origin were obtained, with physical, chemical and mechanical characteristics that make them good candidates for applications in skin wounds, thus suggesting that it is a material with the potential to continue being investigated, biologically, to be used as a possible substitute for skin wounds.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS

INTRODUCCIÓN.....	15
OBJETIVO.....	17
OBJETIVO GENERAL.....	17
METAS.....	17
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO.....	18
MATERIALES Y CIENCIA E INGENIERÍA EN MATERIALES.....	18
BIOMATERIALES.....	19
PIEL.....	22
<i>Histología</i>	22
I. Epidermis.....	22
II. Dermis.....	23
III. Hipodermis.....	24
<i>Lesiones de la piel</i>	24
<i>Cicatrización</i>	25
Cicatrización como problema patológico.....	26
<i>Injertos de piel</i>	27
MEMBRANAS.....	28
COLÁGENA.....	30
<i>Proteínas</i>	30
<i>Aminoácidos</i>	30
<i>Estructura</i>	32
QUITOSANO.....	35
DESCELULARIZACIÓN.....	37
<i>Agentes de descelularización</i>	37
Agentes físicos.....	37
Agentes químicos.....	37
Agentes biológicos.....	38
HUESO DESCELULARIZADO (NUKBONE®).....	39
DESMINERALIZACIÓN.....	40
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	41
REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS.....	41

<i>Reactivos</i>	41
<i>Materiales</i>	41
<i>Equipos</i>	42
PREPARACIÓN DE LAS MEMBRANAS.....	43
<i>Desmineralización</i>	43
<i>Membranas</i>	44
<i>Diagrama de flujo</i>	46
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
DESMINERALIZACIÓN.....	47
<i>Morfología superficial</i>	48
<i>Microscopía Electrónica de Barrido</i>	50
Tamaño de poro.....	53
Análisis Elemental (EDS)	55
<i>Análisis Térmicos</i>	57
Análisis Termogravimétrico.....	57
Calorimetría Diferencial de Barrido.....	60
<i>Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)</i>	62
MEMBRANAS DE COLÁGENA TIPO I.....	64
<i>Morfología superficial</i>	64
<i>Microscopía Electrónica de Barrido</i>	66
Tamaño de poro.....	68
Análisis Elemental (EDS)	69
<i>Análisis Térmicos</i>	70
Análisis Termogravimétrico.....	70
Calorimetría Diferencial de Barrido.....	74
<i>Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)</i>	78
<i>Pruebas Mecánicas</i>	81
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.....	84
BIBLIOGRAFÍA.....	85
FE DE ERRATAS.....	91
ANEXO A.....	92
ANEXO B.....	95

Índice de figuras, tablas y gráficas

Figura 1.1 Corte transversal de la piel. Está constituida por tres capas: epidermis, dermis y la hipodermis, así como por los anexos cutáneos. En la imagen se aprecia el distinto espesor de cada capa, así como su composición [MacNeil, 2008].	24
Tabla 1.1. El proceso de cicatrización se divide en tres fases, cada una de ellas tiene eventos celulares característicos [Salem, 2000], [Guarin, 2013].	25
Figura 1.2. Cicatriz hipertrófica [Salem, 2002].	26
Figura 1.4 Fórmula general de un aminoácido. En color verde se representa el grupo amino (NH_2), en color rojo está representado el grupo carboxilo que se puede desprotonar (COOH), estos grupos siempre están presentes en los α -aminoácidos, y en color azul se encuentra la ramificación que puede variar dando lugar a los 20 distintos aminoácidos que conforman a las proteínas. Mientras que en color negro se representa el carbón central o carbono α con su respectivo hidrógeno.	31
Figura 1.5. Proceso del enlace péptido (enlace covalente) entre dos aminoácidos. Este enlace se forma por la eliminación de elementos de agua (deshidratación) del grupo α -carboxilo de un aminoácido y del grupo α -amino de otro aminoácido [Lehninger, 2005].	31
Figura 1.6. Se muestran las cuatro distintas estructuras que pueden tener las proteínas. La estructura primaria corresponde a la secuencia lineal de aminoácidos, todas las proteínas presentan este tipo de estructura, mientras que las demás estructuras aparecen en ciertas proteínas, entre más estabilidad tenga la proteína contará con un mayor grado de estructura [Lehninger, 2005].	33
Figura 1.7. Representación de las distintas estructuras presentes en la colágena. Se ha encontrado que las unidades más pequeñas (glicina) se agrupan hacia el interior de la triple hélice.	33
Figura 1.8 Estructuras químicas de los polisacáridos de la quitina (a) en este caso siempre se encuentra el grupo acetilo y del quitosano (b) para este caso, el grupo acetilo aparece en la cadena y veces, mientras que en la cadena desacetilada aparece x veces a lo largo de la cadena [Nair, 2007].	36
Tabla 1.2. La composición del hueso está dividido en dos: fase inorgánica y fase orgánica [Gartner, 2014]. A partir de un proceso de desmineralización con una solución acuosa de HCl a 0.5M se obtuvo el porcentaje presente en el Nukbone® de cada una de estas fases.	39
Figura 2.1. a) Se aprecian las dimensiones de las muestras de Nukbone® para realizar las pruebas fisicoquímicas para estandarizar el proceso de desmineralización. b) Montaje experimental.	43
Figura 2.2. Se aprecian las dimensiones de las membranas de colágena, recubiertas superficialmente con quitosano, para realizar las pruebas mecánicas de tensión uniaxial.	45
Figura 2.3 Método de obtención de membranas de colágena tipo I a partir de la desmineralización de hueso de bovino descelularizado.	46

Figura 3.1. Micrografía de la matriz ósea. Se aprecia la distribución y tamaño de poro.....	48
Figura 3.2 Esponjas de colágena tipo I obtenidas de la desmineralización de hueso de bovino descelularizado, con disoluciones de ácido clorhídrico al 2, 4 y 6 Molar.	49
Figura 3.3 Esponjas de colágena tipo I obtenidas de la desmineralización de hueso de bovino descelularizado, con disoluciones de ácido clorhídrico al 0.5, 1, 1.5 M.	49
Figura3.4. Micrografía de la matriz ósea.....	50
Figura 3.5 Esponjas de colágena tipo I obtenidas de la desmineralización de hueso de bovino descelularizado con disoluciones de ácido clorhídrico al 2, 4 y 6M, a un aumento de x50.	51
Figura 3.6 Esponjas de colágena tipo I obtenidas de la desmineralización de hueso de bovino descelularizado con disoluciones de ácido clorhídrico al 0.5, 1 y 1.5M, a un aumento de x50.	52
Gráfica 3.1. Tamaño de poro promedio de las membranas obtenidas a diferentes concentraciones molares de HCl y a distintos tiempos de desmineralización.....	54
Tabla 3.1. Contenido porcentual de C, O, Ca, P, Cl y K en la superficie de las membranas sometidas a diferentes tiempos de desmineralización para una concentración molar mayor a 2M.	56
Tabla 3.2. Análisis elemental, obtenido por EDS, de la superficie de las membranas desmineralizadas a diferentes tiempos para una concentración molar menor a 2M.	56
Gráfica 3.2. Estudio termogravimétrico de las muestras desmineralizadas con una disolución mayor a 2M.	58
Gráfica 3.3. Comportamiento termogravimétrico de las muestras desmineralizadas con una disolución menor a 2M	59
Gráfica 3.4. Arriba. Estudio calorimetría Diferencial de Barrido de las muestras desmineralizadas con una disolución mayor a 2M. Abajo. Muestras desmineralizadas con una disolución menor a 2M. En ambas gráficas se aprecia la presencia distintas temperaturas de desnaturalización y degradación de la colágena (después de los 300°C).	61
Gráfica 3.5. Arriba. Estudio de espectrometría de infrarrojo por transformadas de Fourier de las muestras desmineralizadas con una disolución mayor a 2M. Abajo. Muestras desmineralizadas con una disolución menor a 2M. En ambas gráficas se aprecian las bandas correspondientes a los grupos presentes en la colágena.....	63
Figura 3.7 Superficie de las membranas de colágena tipo I antes y después de ser recubiertas con quitosano. Se aprecia que los poros se sellaron y se mantuvo intacta la morfología de la matriz ósea.	65
Figura 3.8 Micrografías de las membranas obtenidas con una molaridad de 0.5M y 2M, respectivamente. Con el microscopio electrónico se aprecia que la mayoría de los poros en las membranas fueron recubiertos con el quitosano.	66
Figura 3.9 Morfología de las trabéculas en las membranas antes (izquierda) y después (derecha) de ser recubiertas con quitosano.....	67
Figura 3.10 Micrografías de las membranas de colágena tipo I, a un aumento de 50K, con este aumento se aprecia una superficie lisa y sellada, características obtenidas por el recubrimiento de quitosano.	68
Tabla 3.3. Contenido porcentual de C, O, Ca, P, Cl y K en la superficie de las membranas sometidas a diferentes tiempos de desmineralización para una concentración molar 0.5M y 2M. Todas las muestras fueron recubiertas con quitosano y neutralizadas con NaOH.	69
Gráfica 3.6. Termograma de la membrana 0.5M-cQ a una rampa de calentamiento de 10min/°C. Se	

observan 3 regiones de pérdida de masa y con el DTGA fue posible identificar las temperaturas asociadas a esas regiones.....	70
Grafica 3.7. Comportamiento termogravimétrico a una rampa de calentamiento de 10min/°C de la muestra x2M-cQ. Se observan 3 regiones de pérdida de masa.....	71
Gráfica 3.8. Comportamiento termogravimétrico a una rampa de calentamiento de 10min/°C de la muestra x0.5M-cQ. Se observan 3 regiones de pérdida de masa.	72
Gráfica 3.9. Comportamiento termogravimétrico a una rampa de calentamiento de 10min/°C de las distintas muestras. Se observan 3 regiones de pérdida de masa con un comportamiento similar.	73
Tabla 3.5. Estas temperaturas se encontraron por medio de DTGA la primera derivada de la pérdida de masa (%) respecto de la temperatura.	73
Gráfica 3.11. Comportamiento termogravimétrico a una rampa de calentamiento de 10min/°C de la muestra 0.5M-cQ. Se observan, 3 regiones de transiciones endotérmicas y se espera un pico exotérmico por arriba de los 400°C.	74
Gráfica 3.12. Comportamiento termogravimétrico a una rampa de calentamiento de 10min/°C de la muestra 0.2M-cQ. Se observan, 3 regiones de transiciones endotérmicas y se espera un pico exotérmico por arriba de los 400°C.	75
Gráfica 3.13. Comportamiento térmico a una rampa de calentamiento de 10min/°C de las muestras con distintas condiciones. Se observan 3 regiones de transiciones térmicas y un comportamiento similar en todas las muestras.....	77
Tabla 3.6. Se observan 2 regiones de transiciones térmicas. No se aprecia una diferencia significativa en la temperatura de desnaturalización con las concentraciones molares que se trabajaron.....	77
Tabla 3.7. Grupos funcionales identificados en el NUKBONE [®] por medio de la espectroscopia IR [Piña, 2006].	79
Tabla 3.8. Grupos funcionales identificados en la colágena por medio de la espectroscopia IR [León, 2013].	79
Tabla 3.9. Grupos funcionales de amidas identificados en el quitosano por medio de la espectroscopia IR [Hernández, 2009].	79
Gráfica 3.14. Estudio de espectrometría de infrarrojo por transformadas de Fourier de las muestras desmineralizadas con una concentración 0.5M y 2M de HCl con y sin recubrimiento de quitosano, así como de Nukbone [®]	80
Tabla 3.10. Grupos funcionales de amidas identificados en el quitosano por medio de la espectroscopia IR.	80
Gráfica 3.15. Comportamiento mecánico, antes un esfuerzo de tensión uniaxial, en condiciones secas y húmedas de las membranas de colágena tipo I obtenidas de la desmineralización de hueso de bovino descelularizado con disoluciones de ácido clorhídrico al 0.5 y 2M.	82
Tabla 3.9. Comportamiento mecánico en condiciones secas y húmedas de las esponjas de colágena tipo I obtenidas de la desmineralización de hueso de bovino.	83
Tabla A.1 2 Pesos de las muestras de Nukbone [®] antes de ser desmineralizadas con una concentración de 0.5M, cada peso se tomo 4 veces	92
Tabla A.2 Pesos de las muestras de Nukbone [®] antes de ser desmineralizadas con una concentración de 2M, cada peso se tomo 4 veces.	93

Tabla A.3 Pesos de las muestras de Nukbone [®] después de ser desmineralizadas con una concentración de 0.5M, cada peso se tomo 4 veces.	93
Tabla A.4 Pesos de las muestras de Nukbone [®] después de ser desmineralizadas con una concentración de 2M, cada peso se tomo 4 veces.	94
Tabla A.5 Fase inorgánicas y orgánica presente en el Nukbone [®] calculados a partir del proceso de desmineralización con 0.5M.	94
Tabla A. 6 Fase inorgánicas y orgánica presente en el Nukbone [®] calculados a partir del proceso de desmineralización con 2M.	94
Figura B.1. Se aprecia que los poros no colapsaron y se mantuvo intacta la morfología de la matriz ósea, y una superficie similar en los triplicados.....	95
Figura B. 2. Membranas recubiertas con quitosano, se observa que todas las muestras tiene una superficie parecida.	96
Figura B. 3 Micrografías 50 K de aumento en la que se observa la misma estructura de poros en las distintas muestras.	96
Figura B. 4. Comportamiento térmico de membranas, se logra apreciar una tendencia parecida en todas las muestras. Cabe recordar que todas las muestras son independientes entre sí.....	97
Figura B. 5. Temperaturas de desnaturalización, en todas las muestras se obtuvo un valor muy parecido, lo que indica que la estabilidad de la triple hélice y las cadenas lineales no fueron afectadas por el proceso de desmineralización.....	98
Figura B. 6. Del estudio de FTIR se observa que todas las muestras presentaron las bandas asociadas a la colágena y el quitosano en valores muy próximos a los reportados en la literatura. Con este estudio se demuestra que para ambas concentraciones la estabilidad de la estructura de la colágena es la misma.....	99
Figura B. 7. Comportamiento mecánico de las muestras en condiciones secas. Las diferencias que se notan en las curvas se deben al tipo de mordazas que fueron empleadas.	100
Figura B. 8. En éste caso, el módulo de Young en condiciones húmedas fue menor ya que la capacidad de absorción de las membranas de colágena esta relaciona con sus propiedades mecánicas. Ambos valores de módulo de Young entra en el rango de elasticidad que tiene la piel humana.	101

INTRODUCCIÓN

La principal barrera de protección contra el medio exterior que tiene el ser humano es la piel, además de ser el órgano más grande del cuerpo, histológicamente está compuesto por tres capas o tejidos: la epidermis, la dermis y la hipodermis o tejido subcutáneo [Gartner, 2014]. Cuando ocurren lesiones o alteraciones en la integridad de los tejidos que componen la piel, que estén relacionadas con enfermedades o lesiones traumáticas, no sólo afectan la apariencia estética del paciente, también es posible que induzcan infecciones graves que incluso pueden provocar la muerte. En ocasiones es muy importante substituir el tejido dañado lo antes posible para evitar infecciones en el organismo [Salem, 2002], [Rosanova, 2011], [Tinoco, 2020]. Es por eso que se han desarrollado diversas alternativas [Dantzer, 2015], entre ellas se encuentran los andamios celulares para la regeneración tisular [Martínez, 2012], [Colorado, 2013], [Nyame, 2015], [Boyce, 2018], [Urciuolo, 2019] en particular, las membranas reabsorbibles elaboradas de materiales naturales o sintéticos, [Nyman, 1987], [Bernales, 2004], [Ghanaati, 2012], [Sbricoli, 2019].

Entre las membranas reabsorbibles obtenidas a partir de materiales naturales se encuentran las obtenidas a partir de tejido óseo. En este trabajo se estudiarán las propiedades físicas, químicas y mecánicas de membranas de colágena tipo I obtenidas a partir de la desmineralización de hueso de bovino descelularizado (Nukbone®), así como su composición química, en particular se realizará un estudio de la morfología, estabilidad térmica, y resistencia a la tensión uniaxial de dichas membranas.

Se obtuvieron membranas de colágena tipo I con la finalidad de cubrir la zona del organismo faltante de tejido cutáneo, ante una herida de gran extensión o crónica, que lo proteja del medio ambiente externo y permita al mismo tiempo la salida de sustancias tóxicas del organismo. Estas membranas son obtenidas de la desmineralización de hueso de bovino descélularizado (Nukbone®) [León, 2013]. Con este proceso se obtienen poros grandes que pueden permitir la entrada de patógenos al organismo, por lo cual las membranas fueron recubiertas con quitosano, con tamaño de poros en promedio de $163.33 \pm 21.54 \mu\text{m}$ de diámetro en la superficie para lograr hacer una barrera antimicrobiana.

En los dos primeros capítulos se hace una revisión de conceptos necesarios para sustentar este trabajo. En el tercero se presentan el objetivo general y las metas que se propusieron para alcanzar el objetivo general de este trabajo. En el cuarto se explica la metodología utilizada. En el quinto, se presentan y discuten los resultados tanto del proceso de desmineralización como de las propiedades físicas, químicas y mecánicas obtenidas para las membranas de colágena tipo I. Finalmente, en el último capítulo se discuten los principales resultados de la presente investigación, así como sus posibles extensiones.

OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal de este trabajo es obtener, y caracterizar física, química y mecánicamente, un andamio de colágena tipo I obtenido a partir de la desmineralización de hueso de bovino descelularizado, que pueda ser usado como sustituto cutáneo en pacientes con heridas cutáneas de larga extensión o crónicas.

METAS

1. Variando dos parámetros en el proceso de desmineralización obtener membranas de colágena tipo I a partir de hueso de tendón de bovino descelularizado:

Variables	Primera parte	Segunda parte
Concentración molar [M]	2, 4 y 6	0.5, 1 y 1.5
Tiempo [minutos]	15, 30, 45 y 60	10, 20 y 30

2. Determinar las características de las membranas de colágena tipo I mediante:
 - Microscopía electrónica de barrido (por sus siglas en inglés, SEM).
 - Análisis térmico (por sus siglas en inglés, TGA y DSC).
 - Espectroscopia infrarroja (por sus siglas en inglés, FTIR).
3. Recubrir superficialmente las membranas con quitosano y caracterizar:
 - Microscopía electrónica de barrido (SEM).
 - Análisis térmico (TGA y DSC).
 - Espectroscopia infrarroja (FTIR).
 - Ensayo de tensión uniaxial en condiciones secas y húmedas

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

Materiales y Ciencia e Ingeniería en Materiales

El desarrollo de la humanidad ha estado profundamente ligado a la capacidad para producir y desarrollar los materiales necesarios para satisfacer las necesidades de la humanidad, es por ello que históricamente las primeras civilizaciones llevan por nombre el material que alcanzó mayor desarrollo: Edad de Piedra, Edad de Bronce, Edad de Hierro, etc.

En la actualidad la Ciencia e Ingeniería en Materiales es la disciplina que investiga la relación entre la estructura, las propiedades y las aplicaciones de los materiales [Callister, 2016]. Su estudio nos permite además diseñar nuevos materiales con nuevas propiedades para su uso en nuevas aplicaciones.

Por otro lado, las propiedades de los materiales determinan el tipo y magnitud de la respuesta producida por el material sometido a un estímulo específico [Callister, 2016]. El estudio de las propiedades mecánicas nos proporciona el comportamiento del material a fuerzas aplicadas sobre él [Askeland, 1998]. En cuanto a las propiedades físicas y químicas se encuentran las propiedades eléctricas, magnéticas, térmicas, ópticas, composición elemental, resistencia a la corrosión, solubilidad, etc., las propiedades intensivas son independientes de la forma, masa y el tamaño del material, dependen tanto de la estructura como del procesamiento o método de obtención del material.

El procesamiento del material determinará la estructura y las propiedades de éste, es decir, se puede tener la misma materia prima y por medio de distintos procesamientos se obtendrán distintas estructuras y propiedades, en conclusión el procesamiento del material influye en la relación estructura y propiedades, es por ello que es un factor a estudiar por la Ciencia e Ingeniería de los Materiales.

Los materiales se clasifican en cinco grupos: metálicos, cerámicos, polímeros, semiconductores y compuestos, cada uno de estos grupos poseen estructuras y propiedades distintas [Askeland, 1998].

Biomateriales

Cuando los materiales son usados dentro del cuerpo humano o en contacto con tejidos vivos, como los que se desarrollan en este trabajo, se denominan biomateriales. Definir qué es un biomaterial no es fácil ya que compete a varias disciplinas. Una de las mejores definiciones que existen de un biomaterial es: “material destinado a interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función de cuerpo humano [Merolli, 2009]”.

En otras palabras, un biomaterial es aquel material que presenta biocompatibilidad con el cuerpo humano, es decir, es un material para aplicaciones médicas que provoca una mínima respuesta inmune e inflamatoria sobre la zona del cuerpo donde es colocado [O’Brien, 2010], [Jiménez, 2004].

Existen diversas aplicaciones de los biomateriales, entre ellas están biomateriales para la liberación controlada de fármacos, prótesis, implantes, membranas de barrera, instrumentos quirúrgicos, sustitutos cutáneos, andamios celulares, etc.

Para el estudio de los biomateriales se pueden clasificar a partir de su función en inertes, biodegradables, bioactivos.

De esta manera, se denomina material inerte o casi inerte aquel que no sufre ningún cambio químico evaluable después de un tiempo prolongado de contacto en el medio biológico. Un ejemplo típico de este material es la alúmina. Se puede decir, que el organismo y el material no se causan daño mutuamente.

El material biodegradable es aquel que al ser implantado, se degrada gradualmente en los fluidos y tejidos corporales. Son diseñados para degradarse en un periodo y ser reemplazados por el tejido huésped natural. Un ejemplo de este material son los hilos de sutura.

Se considera material bioactivo, aquel capaz de interactuar directamente con el medio biológico, en ausencia de una interfase de naturaleza diferente a la del tejido en el que es implantado, o sea que es aquel que produce una respuesta

biológica específica en la interfase, la cual resulta en la formación de una unión entre los tejidos y el material. Un ejemplo de este material es la hidroxiapatita en contacto con hueso [García, 2001].

Igualmente, la investigación de éstos materiales comprende el estudio de la interacción entre el material y el medio fisiológico, por lo cual es importante determinar las propiedades físicas, químicas, mecánicas, biológicas y médicas del biomaterial. Al momento de diseñar un biomaterial es importante tener en cuenta la composición, la aplicación que tendrá y el proceso de obtención del material, debido a que estos factores determinan las propiedades del biomaterial.

Los materiales pueden presentar diversas alteraciones superficiales como son la corrosión, la solubilidad de algunos componentes o su desintegración en función del tiempo. De este modo el material debe poseer un apropiado grado de degradación para asegurar el mantenimiento de una estructura necesaria, ésta degradación depende entre otras cosas, de la porosidad del material [Soria, 2009]. Los productos de esta degradación no deben ser tóxicos pero deben ser capaces de ser metabolizados por el cuerpo o poder salir del cuerpo sin interferir con otros órganos o tejidos [Fergal, 2011].

Entre las propiedades físicas a destacar se encuentran las propiedades térmicas del material, al determinar las transiciones térmicas, y de éstas no solo se puede obtener información en relación de la temperatura a la cual ocurre éste fenómeno, también se puede determinar las energías de fusión, cristalización, además de calcular el grado de cristalinidad, pureza, etc., y en el caso particular de proteínas, obtener la temperatura de desnaturalización. Es importante tener conocimiento de éstas temperaturas para tener un buen procesamiento del material y asegurar un óptimo funcionamiento dentro del cuerpo humano.

Lo ideal para un biomaterial es que sea poroso, con un tamaño de poro lo suficientemente grande para permitir que las células migren dentro de la estructura y permitir un proceso de vascularización adecuado, los poros deben estar interconectados para asegurar la penetración celular y la adecuada difusión de nutrientes a las células dentro del material [Murphy, 2010] [O'Brien, 2010] [Gong

S, 2006]. La rugosidad es un factor importante para la adhesión, proliferación y diferenciación celular [Wan, 2005].

Para el éxito de cualquier biomaterial es importante tener un equilibrio entre las propiedades mecánicas y morfología porosa suficiente para permitir la repoblación celular y con ello permitir un proceso de vascularización adecuado [Fergal, 2011].

Es importante conocer las interacciones entre el material y el medio biológico en el cual es colocado. Como ya se mencionó, el material debe exhibir un grado controlado de degradación y durante este proceso el material debe generar productos no tóxicos y capaces de ser metabolizados por el cuerpo o salir del cuerpo sin interferir con el funcionamiento de otros órganos. Además el material debe ser compatible químicamente con soluciones acuosas y fisiológicas, producir una mínima respuesta inmune [Soria, 2009].

Para estudiar las interacciones que tiene el material con el medio biológico, los experimentos que se llevan a cabo son: “*in vitro*” e “*in vivo*”. Las pruebas *in vitro* miden las interacciones del material con las células y se llevan a cabo fuera del organismo bajo condiciones controladas en cultivos celulares. Se mide la citotoxicidad, genotoxicidad, hemocompatibilidad, mutagenicidad, etc., que produce el material en un cultivo celular.

Por otro lado, las pruebas *in vivo* se realizan en animales. En este caso las pruebas a evaluar son sensibilización, irritación, inflamación, toxicidad sistémica, etc., en el organismo completo.

Si el material resulta tóxico en las pruebas *in vitro* no se hacen las pruebas *in vivo*, por lo que un biomaterial debe cumplir forzosamente con ambas, ya que si un material falla las pruebas *in vitro* ocasionaría problemas adversos como mutaciones o inclusive la muerte al organismo vivo en el cual se realicen las pruebas *in vivo*.

Piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo y desempeña distintas funciones que incluyen:

- Actúa como barrera entre el organismo y el entorno, brinda protección frente a agentes externos mecánicos, químicos, radiantes y microorganismos patogénicos.
- Regula la temperatura del cuerpo.
- Provee de sensación de presión, dolor y temperatura, es un órgano sensorial.

Tiene diversos mecanismos de protección, entre ellos: pH ácido, inmunidad innata y humoral, descamación del estrato córneo y una flora de combate contra patógenos. Su peso corresponde al 6% del corporal pero va cambiando con la edad, con un promedio de 5 kg, aproximadamente 500 g corresponden a la epidermis [Zeas, 2016].

Histología

La piel tiene tres capas [Gartner, 2014] [Navarrete, 2003], en la figura 1.1 se observan las tres capas que histológicamente componen a la piel:

1. Superficial o epidermis.
2. Media o dermis.
3. Profunda o hipodermis, también llamada tejido subcutáneo.

1. Epidermis

Es la capa más externa de la piel y es la principal barrera física que hace frente a los patógenos, por lo que mantiene un pH ácido, entre 4.5 y 5.9, para así evitar la proliferación de microorganismos sobre la superficie de la piel. Es un tejido avascular. Está constituida por cinco capas que van de la superficie a la profundidad:

1. Estrato córneo: Está en contacto con el exterior; su grosor varía de acuerdo a la región anatómica en donde se encuentre.
2. Estrato lúcido: Está presente sólo en piel gruesa.
3. Estrato granuloso: Está presente en la piel gruesa.
4. Estrato espinoso: Está formada por queratinocitos.
5. Estrato basal o germinatorio: Esta membrana basal porosa permite el intercambio de células y fluidos desde la dermis hasta la epidermis.

II. Dermis

Es la siguiente capa de la piel desde la superficie. Es una estructura de sostén, es firme pero elástica, tiene un grosor entre 1 y 4 mm, es decir, de 20 a 40 veces más gruesa que la epidermis. Le proporciona flexibilidad, elasticidad y resistencia a la tensión al cuerpo humano. Además, es el lugar donde se produce una respuesta inmune, por parte de los macrófagos, ante la presencia de bacterias, virus y parásitos que han penetrado la barrera de la epidermis. Está constituida por dos capas:

1. Dermis papilar: Formadas por fibras de colágena tipo I, III y VII, elásticas y reticulares, además de sustancia fundamental. Posee numerosos capilares. El tejido fibroso se orienta en sentido vertical.
2. Dermis reticular: Constituidas por fibras de colágena más gruesas y numerosas, que están entrecruzadas como redes. También hay fibras elásticas formadas por elastina. En esta capa encontramos arterias y venas, así como pequeños vasos linfáticos.

Los nervios y los vasos sanguíneos corren por la dermis, y debajo de ella se encuentra una capa de grasa subcutánea. Esta capa de la piel cuenta con varios apéndices cutáneos: glándulas sudoríparas ecrinas y apocrinas, folículos pilosos y glándulas sebáceas. Esto hace que la dermis, además, cumpla con una función protectora y sensorial, regula la temperatura y lubrica la piel.

III. Hipodermis

Llamada también tejido celular subcutáneo o adiposo, proporciona aislamiento térmico al cuerpo, forma una especie de amortiguador de los tejidos profundos de los traumatismos no penetrantes, y sirve como fuente nutritiva de reserva. Formada por adipocitos que elaboran y almacenan grasa [Gartner, 2014].

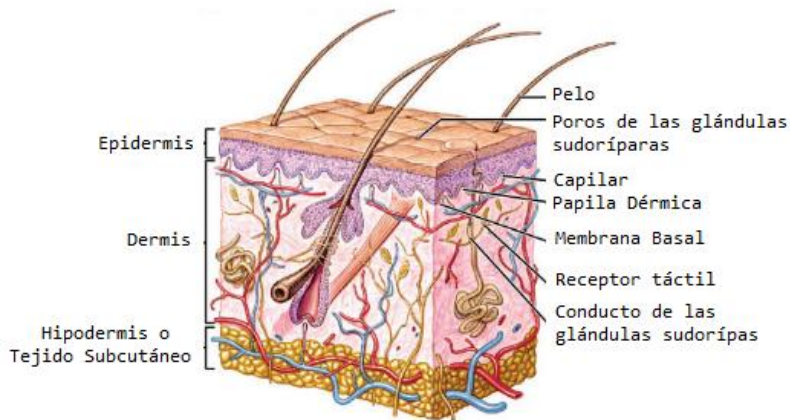


Figura 1.1 Corte transversal de la piel. Está constituida por tres capas: epidermis, dermis y la hipodermis, así como por los anexos cutáneos. En la imagen se aprecia el distinto espesor de cada capa, así como su composición [MacNeil, 2008].

Lesiones de la piel

Las heridas o lesiones son rupturas en la estructura de la piel que comprometen su función. Dependiendo de la profundidad se clasifican en:

- Superficiales: Afectan principalmente la epidermis y se curan rápidamente por medio de la queratogénesis.
- Espesor parcial: Involucran tanto epidermis como dermis, requieren de una curación más extensa.
- Espesor total: Este tipo de lesiones incluyen las tres capas de la piel y en algunos casos hasta músculo y hueso [Benjakul, 2010].

Entre las lesiones más comunes se encuentran las quemaduras, úlceras de pie diabético, vasculares y de presión, y lesiones generadas por un trauma.

Cicatrización

La piel se regenera de forma natural a través del proceso de cicatrización y se lleva a cabo inmediatamente de que ocurre una lesión. Es un proceso de reparación ordenado, está compuesto por tres fases en la tabla 1.1 se explica de forma más detallada cada fase, permite restituir las características y funciones del tejido, intenta devolver la integridad anatómica, funcional y estética de los tejidos lesionados dejando una cicatriz.

Tabla1.1. El proceso de cicatrización se divide en tres fases, cada una de ellas tiene eventos celulares característicos [Salem, 2000], [Guarin, 2013].

Fases	Eventos
Inflamatoria	Comienza tras el daño tisular, células llegan a fagocitar y eliminar las bacterias, además se liberan factores de crecimiento ¹ que producen la migración y división celular para que ocurra la siguiente fase.
Proliferación	Se caracteriza por la angiogénesis ² , aumento de fibras de colágena, formación de tejido granular, epitelización y, por lo tanto, contracción de la herida.
Remodelación	La generación de nuevas fibras de colágena y la diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos, que aumentan la fuerza tensil y permiten la aproximación de los bordes de la lesión.

¹ Factores de crecimiento. Son un conjunto de sustancias, la mayoría de naturaleza proteica que junto con las hormonas y los neurotransmisores desempeñan una importante función en la comunicación intercelular. La función principal de los factores de crecimiento es la del control externo del ciclo celular.

² Angiogénesis. Proceso fisiológico de creación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes.

Cicatrización como problema patológico

Las cicatrices patológicas se producen como parte de la respuesta fisiológica normal del organismo a una alteración de la integridad de cualquiera de los tejidos que lo componen. Pueden clasificarse en hipertróficas y queloides [Senet, 2008]

La cicatriz hipertrófica es una lesión fibrosa, de color rojo, levantada y que causa comezón, se forma dentro de los bordes iniciales de una herida, habitualmente en un área de tensión, presenta poca reaparición tras la extirpación quirúrgica, en la figura 1.2 se muestra un ejemplo de cicatriz hipertrófica.

La cicatriz queloide es una lesión con aspecto tumoral, color rojo rosado o púrpura y a veces hiperpigmentada. Los contornos están bien demarcados, pero son irregulares, sobrepasando los márgenes iniciales de la herida. El epitelio sobre la lesión es delgado y puede presentar áreas focales de ulceración. Puede presentar prurito y dolor. Raramente regresa en forma espontánea y la reaparición es muy frecuente pos extirpación quirúrgica, la figura 1.3 ejemplifica éste tipo de cicatriz [Salem, 2002].



Figura 1.2. Cicatriz hipertrófica [Salem, 2002].



Figura 1.3. Cicatriz queloide [Senet, 2008].

El proceso fisiológico de cicatrización tras una enfermedad o lesión traumática, quirúrgica o de cualquier otra naturaleza, afecta a todos los órganos del cuerpo humano como consecuencia directa de su función protectora de los órganos internos frente a cualquier agresión externa [Herranz, 2012].

La cicatrización cutánea se define como la alteración macroscópica de la estructura y función normales de la piel, originada por la aparición de tejido dérmico fibroso de reemplazo, que se desarrolla tras la curación de una herida. En el caso de una herida de más de 4 cm de diámetro, o en el caso de heridas crónicas este proceso de cicatrización no se puede llevar de manera natural ni de forma exitosa, por lo que se recurre a sustitutos cutáneos.

Estos sustitutos cutáneos son: injertos de piel y andamios tisulares hechos a partir de materiales naturales o sintéticos, dentro de ellos se encuentran los polímeros biodegradables: ácido poliláctico (PLA), ϵ -caprolactona, colágena, elastina albúmina, polisacáridos, etc.

En las siguientes secciones se abordarán los sustitutos cutáneos más utilizados.

Injertos de piel

Un injerto de piel es un pedazo de piel sana extraída de un área del cuerpo para reparar piel dañada o faltante en otra parte del cuerpo. Los injertos se pueden clasificar por diversas características, a continuación, se mencionan los más usados. Según los agentes dadores y receptores:

- Autoinjerto o injerto autólogo: proviene del mismo individuo.
- Isoinjerto: proviene de individuos genéticamente idénticos.
- Aloinjerto u homoinjerto: proviene de individuos de la misma especie.
- Xenoinjerto o heteroinjerto: proviene de distinta especie.

Todos los injertos de piel están constituidos por epidermis y porciones variables de dermis [Andrades, 2000].

Se han realizado muchos esfuerzos para desarrollar sustitutos de piel sin necesidad de donantes por medio de la ingeniería de tejidos, los cuales permitan aumentar la disponibilidad de sustitutos cutáneos para colocar en caso de lesiones extensas. En este aspecto, se debe tener en cuenta que se considera que cualquier lesión cutánea de más de 4 cm de diámetro no sanará correctamente sin un injerto [Chaves, 2014]. Aunque hasta ahora no se ha podido reconstruir en su totalidad la compleja estructura de la piel. Como características ideales para los andamios se busca que sean capaces de resistir infecciones y soportar la hipoxia³ en la lesión, así como que sean resistentes, costo-eficientes, fáciles de preparar, almacenar, usar y adquirir, con espesor flexible, ausencia de inmunogenicidad, resistencia a microorganismos, estabilidad térmica a largo plazo y reabsorbibles. Además, es deseable que provean de cobertura permanente a la herida, recreando los componentes dérmicos y epidérmicos naturales [Chern, 2009] [Shores, 2007]. Entre los andamios más utilizados se encuentran las membranas reabsorbibles de colágena [Hafemann, 1999], [Tonhi, 2002], [Maurer, 2018].

Membranas

Se define membrana una lámina, generalmente flexible y resistente a la tracción, es decir, a esfuerzos de tensión. Tienen diversas funciones como son: envolver, proteger, aislar, defender, nutrir o delimitar las estructuras, según el caso. En los seres animales o vegetales, entre sus funciones están la de recubrir un órgano o un conducto o la de separar o conectar dos cavidades o estructuras adyacentes. A partir de la observación de la naturaleza se han diseñado una gran variedad de membranas para aplicaciones en diversas industrias.

Para aplicaciones médicas una membrana ideal debe presentar ciertas características: biocompatibilidad para prevenir reacciones adversas con los tejidos circundantes y el organismo, integración tisular para favorecer la incrustación en el tejido circundante, estabilidad dimensional ya que el posicionamiento [Sbricoli,2019] y la forma de la membrana deben permanecer

³ Hipoxia. Disminución del oxígeno disponible.

inalterados hasta que ocurra la degradación de la membrana si así se diseñó, debe ser manejable y fácilmente colocable [Calciolari, 2018].

Estas membranas con aplicaciones médicas pueden ser de barrera o reabsorbibles. Las membranas de barrera se mantienen inertes por un periodo prolongado por estar elaboradas con un material no degradable, a veces es necesario un segundo procedimiento quirúrgico para remover las membranas [Ghanaati, 2012].

Las membranas reabsorbibles comúnmente usadas para la regeneración tisular guiada (RTG) están elaboradas de polímeros como colágena, ácido poliglicólico (por sus siglas en inglés *polyglycolic acid*, PGA), ácido poliláctico (PLA), etc., o copolímeros de estos materiales [Hafemann, 1999], [Tonhi, 2002], [Rulf, 2005], [Dimitriou, 2012], [Ghanaati, 2012], [Kharaziha, 2013], [Maurer, 2018], [Sbricoli, 2019]. La reabsorción puede ser un punto positivo para la RTG, debido a que un segundo procedimiento quirúrgico es evitado, este tipo de membranas debe producir una respuesta inflamatoria mínima y no debe interferir con el proceso de regeneración.

Como se mencionó anteriormente, hay membranas disponibles comercialmente que tienen como principal componente a la colágena tipo I [Nyman, 1987], ya que es el mayor componente de la matriz extracelular⁴ en mamíferos, además de sus características como son: su estructura, baja inmunogenicidad, buena capacidad hemostática, es decir tiene buena capacidad para detener procesos hemorrágicos, presenta alta biocompatibilidad, y tiene la capacidad de inducir una respuesta inflamatoria e inmune mínima en el organismo. Es por eso que las membranas reabsorbibles son una buena opción para la regeneración cutánea.

⁴ Matriz Extracelular (MEC). Es el componente macromolecular principal de los tejidos y órganos que da soporte a las células, guía las interacciones entre ellas, proporciona los patrones adecuados para su establecimiento, diferenciación y migración; por lo que de ella depende el buen funcionamiento de los tejidos [Hernández, 2016].

Colágena

La mayoría de los sustitutos cutáneos están elaborados de colágena tipo I pues es la que se encuentra en la piel.

El término colágena es usado para referirse a una familia de distintas proteínas, cada una con estructura, función y distribución en tejidos específicos. Existen alrededor de 28 tipos de colágena genéticamente distintas. Siendo las más comunes las tipo I y IV.

Proteínas

Las proteínas son el principal componente estructural de muchos tejidos, son esencialmente polímeros constituidos a partir de un conjunto de veinte aminoácidos, cada aminoácido está unido al siguiente de forma covalente, formando secuencias lineales. Cada uno de estos aminoácidos tiene una cadena lateral (figura 1.4) característica que determina sus propiedades químicas, por lo que se considera a este grupo de veinte moléculas como precursoras.

Aminoácidos

De los 20 aminoácidos, 19 son conocidos como α -aminoácidos, es decir que tienen un carbono quiral (carbono α), unido a cuatro grupos distintos. La glicina no cumple con esta característica ya que dos sustituyentes son iguales (H). Éstos α -aminoácidos tienen un grupo carboxilo y un grupo amino unidos al átomo de carbono quiral o central. En la figura 1.4 se observa la estructura que presentan los 20 aminoácidos.

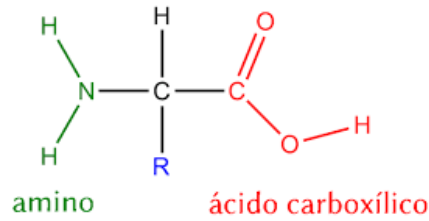


Figura1.4 Fórmula general de un aminoácido. En color verde se representa el grupo amino (NH₂), en color rojo está representado el grupo carboxilo que se puede desprotonar (COOH), estos grupos siempre están presentes en los α-aminoácidos, y en color azul se encuentra la ramificación que puede variar dando lugar a los 20 distintos aminoácidos que conforman a las proteínas. Mientras que en color negro se representa el carbón central o carbono α con su respectivo hidrógeno.

Dos aminoácidos pueden unirse de forma covalente a través de un enlace amida sustituido, denominado enlace peptídico, este enlace se forma por la eliminación de los elementos del agua del grupo α-carboxilo de un aminoácido y el grupo α-amino del otro, este proceso se ejemplifica en la figura 1.5 [Lehninger, 2005].

Cuando se unen unos pocos aminoácidos, alrededor de 10 cadenas, la estructura resultante se denomina oligopéptido. Cuando se unen muchos aminoácidos el producto se denomina polipéptido. Una proteína normalmente es una cadena polipeptídica larga, de 80 o más aminoácidos.

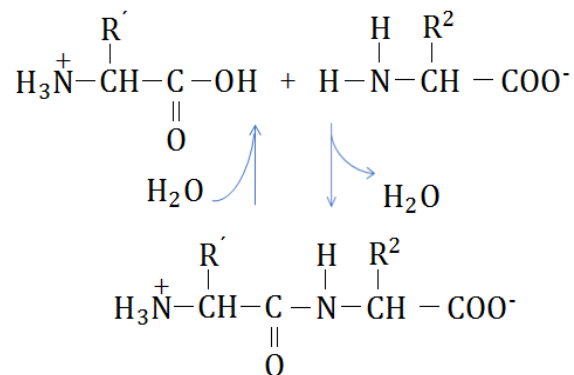


Figura 1.5. Proceso del enlace péptido (enlace covalente) entre dos aminoácidos. Este enlace se forma por la eliminación de elementos de agua (deshidratación) del grupo α-carboxilo de un aminoácido y del grupo α-amino de otro aminoácido [Lehninger, 2005].

Se pueden unir tres aminoácidos mediante dos enlaces peptídicos para formar un tripéptido; de manera similar se pueden unir aminoácidos para formar tetrapéptidos, pentapéptidos y así sucesivamente.

Estructura

El cuerpo humano es capaz de sintetizar una amplia gama de proteínas en las que las moléculas precursoras pasan a través de cuatro estructuras principales para convertirse en proteínas funcionales.

La primera estructura consiste en la formación de una secuencia lineal de los aminoácidos presentes en la proteína, unidos por enlaces peptídicos. A ésta cadena lineal se le conoce como estructura primaria. Posteriormente, estos aminoácidos de la estructura lineal participan en los enlaces tipo puente de hidrógeno, que se forman entre el oxígeno e hidrógenos del enlace peptídico entre aminoácidos distintos de la cadena polipeptídica, para formar la estructura secundaria; las más estables son: una hélice α u hoja plegada β . Estas estructuras secundarias se unen para formar estructuras tridimensionales, las llamadas estructuras terciarias, que a su vez interactúan con otras cadenas de proteínas para formar la estructura cuaternaria de una proteína. Estas cuatro estructuras se aprecian en la figura 1.6.

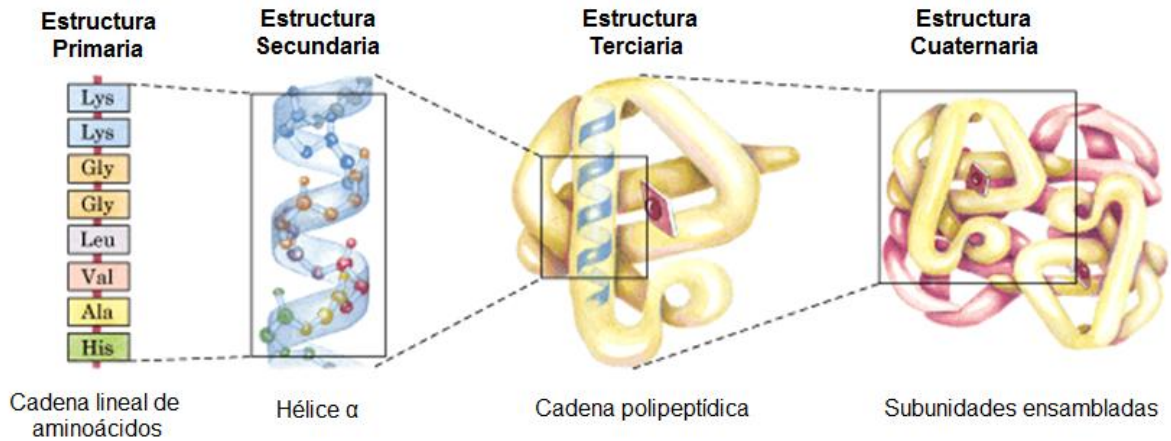


Figura 1.6. Se muestran las cuatro distintas estructuras que pueden tener las proteínas. La estructura primaria corresponde a la secuencia lineal de aminoácidos, todas las proteínas presentan este tipo de estructura, mientras que las demás estructuras aparecen en ciertas proteínas, entre más estabilidad tenga la proteína contará con un mayor grado de estructura [Lehninger, 2005]. .

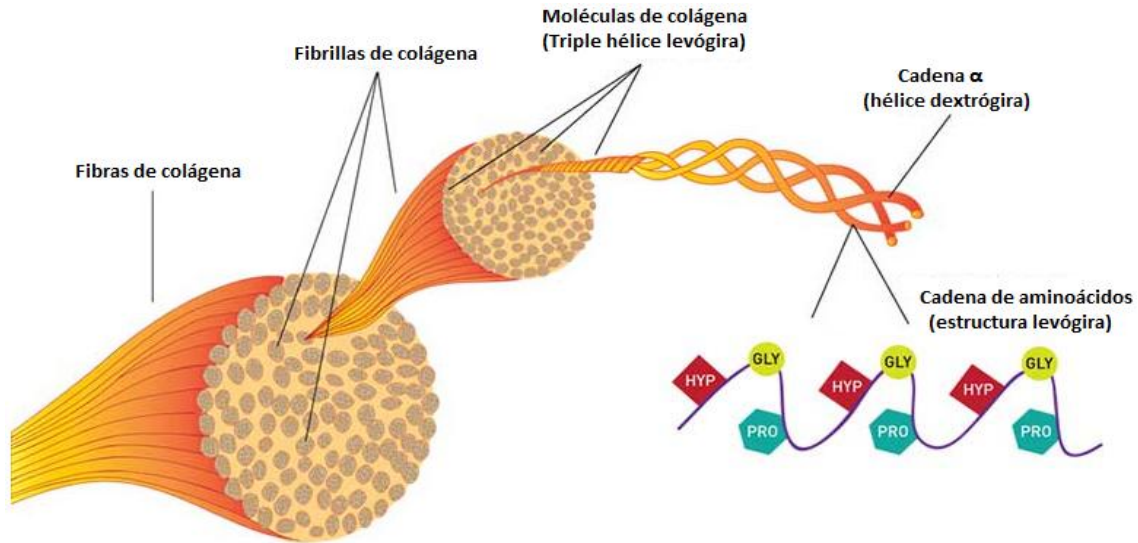


Figura 1.7. Representación de las distintas estructuras presentes en la colágena. Se ha encontrado que las unidades más pequeñas (glicina) se agrupan hacia el interior de la triple hélice.

En cuanto a la proteína de colágena, en la figura 1.7 se observa la cadena lineal de aminoácidos, la hélice α y la triple hélice α . La estructura primaria de esta familia de proteínas está compuesta por la repetición de tripletes de $(\text{Gly-X-Y})_n$, donde Gly es el aminoácido glicina, X es la prolina e Y la hidroxiprolina. El contenido de glicina explica la flexibilidad de la cadena por lo tanto un aumento de glicina en la cadena da lugar a una mayor flexibilidad.

Diez de estas cadenas polipeptídicas forman la cadena α de la colágena que se agrupan para formar la estructura secundaria: una hélice levógira. Una estructura terciaria dextrógira es formada a partir del acomodo de tres estructuras secundarias [Ramshaw, 2009].

Las fibras formadas están orientadas de manera diferente en cada uno de los distintos tipos de tejido para tener la fuerza mecánica adecuada.

La colágena tipo I es la proteína más abundante en mamíferos. Suele ser usada como andamio para implantes degradables [Del Prado, 2016] [Hidalgo, 2018], debido a que es el componente mayoritario del tejido conjuntivo. El hecho de que la colágena presente una baja antigenicidad y alta biocompatibilidad favorece su uso en andamios con aplicaciones médicas. Además, su versatilidad y facilidad de manufactura ha permitido su fabricación en distintas formas [Cen, 2008]: esponjas, películas, soluciones inyectables, hidrogeles, etc.

El proceso de degradación en la colágena ocurre por procesos enzimáticos dentro del cuerpo a través de enzimas, tales como, colágenasas y metaloproteínas, para dar lugar a los aminoácidos correspondiente.

Las principales fuentes de colágena para aplicaciones médicas son la piel bovina o porcina, y el tendón de Aquiles bovino o equino.

Quitosano

El quitosano es un polímero que no existe de forma natural, se obtiene a través del proceso de desacetilación del polímero natural, la quitina. La quitina es un polímero acetilado, y se encuentra en los exoesqueletos de artrópodos (crustáceos, insectos y arañas) y en la pared celular de algunos hongos, levaduras y algas. La estructura lineal de la quitina está constituida por unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces β -D (1,4) [Zulay, 2011].

Estructuralmente, el quitosano es un polisacárido lineal compuesto por dos unidades estructurales: N-acetil-D-glucosamina y la D-glucosamina, distribuidas de manera aleatoria a lo largo de la cadena. Estas unidades se encuentran unidas entre sí por enlaces del tipo β (1-4) glicosídicos, localizados aleatoriamente, a lo largo de la cadena lineal dependiendo del grado de desacetilación (DD), que indica el número de grupos aminos (NH_2) a lo largo de la cadena [Croisier, 2013], en la figura 1.8 se muestran las estructuras de quitina y quitosano. La quitina no puede ser desacetilada al 100%. El quitosano es un polímero semicristalino y ha sido catalogado como el segundo más abundante en la naturaleza después de la celulosa. El quitosano presenta una serie de propiedades únicas tales como biocompatibilidad, biodegradabilidad, actividad antibacteriana con propiedades antifúngicas, antimicrobianas y antivirales [Rodríguez, 2009], además de adherencia, efecto analgésico y hemostático. La cantidad de propiedades que presenta el quitosano le permite su aplicación en diferentes industrias tales como: alimentos, medicina y de cosméticos, así como en la agricultura y en la remoción de metales pesados para el tratamiento de aguas residuales provenientes de industrias [Lárez, 2003].

La quitina es insoluble en los solventes comunes y por ello es que están limitadas sus aplicaciones. A diferencia, el quitosano es soluble en soluciones acuosas ácidas ($\text{pH} < 6$) [Gacén, 1996].

Debido a la alta densidad de cargas positivas, el quitosano se comporta en soluciones ácidas acuosas como una molécula policatiónica y puede formar iones

complejos con una gran variedad de especies aniónicas tanto naturales como sintéticas, tales como, lípidos, proteínas, ADN, y polímeros naturales o sintéticos con carga negativa [Croisier, 2013]. La compatibilidad del quitosano con medios fisiológicos depende del método de preparación y del grado de desacetilación.

La biodegradación del quitosano se explica por la presencia de enlaces glicosídicos frágiles, que al romperse forman oligosacáridos no tóxicos que pueden ser metabolizados o ser excretados por el cuerpo. Este proceso de degradación *in vivo* ocurre por la presencia de diversas proteasas y lisozimas

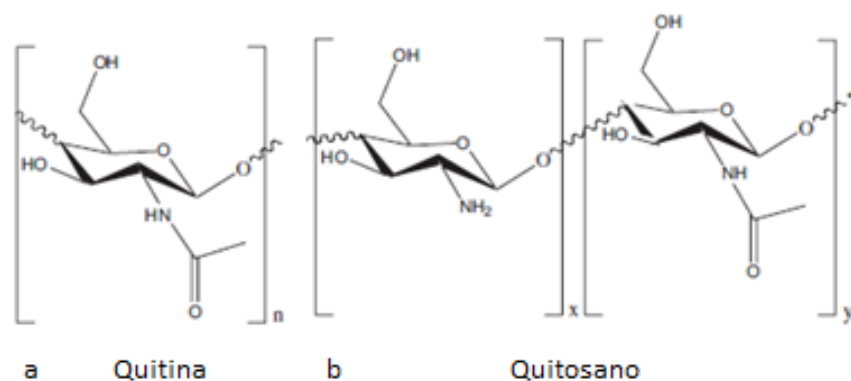


Figura 1.8 Estructuras químicas de los polisacáridos de la quitina (a) en este caso siempre se encuentra el grupo acetilo y del quitosano (b) para este caso, el grupo acetilo aparece en la cadena y veces, mientras que en la cadena desacetilada aparece x veces a lo largo de la cadena [Nair, 2007].

Descelularización

El proceso de descelularización consiste en una serie de pasos que tienen como objetivo eliminar los componentes celulares de un tejido u órgano en específico [Giraldo, 2016], ya que estas células pueden ser reconocidas como agentes extraños por el sistema inmune receptor causando una respuesta inmune aguda y provocando el rechazo del andamio [Martínez, 2015]. Con la remoción del material celular del tejido u órgano se genera un andamio de matriz extracelular (de sus siglas en inglés, MEC) que se compone principalmente de diversas proteínas tales como colágena, elastina y fibronectina [Rana, 2015].

Entre las ventajas que presentan los andamios obtenidos por este proceso se encuentran: la MEC resultante contiene la microestructura nativa, es decir mantiene la vascularidad, estabilidad mecánica y porosidad del tejido u órgano nativo, además de poseer buena biocompatibilidad y ser una buena opción económica para las aplicaciones médicas.

Agentes de descelularización

Este proceso de descelularización está constituido por distintos tratamientos, llamados agentes, que en combinación ofrecen una mayor efectividad. Estos agentes se clasifican en: físicos, químicos y biológicos.

Agentes físicos

Este tipo de agentes tiene como objetivo romper las membranas celulares por medio de estímulos físicos, esto se logra a partir de la variación de la temperatura, en otras palabras ciclos de congelación y descongelación, fuerza, presión sobre el tejido u órgano, así como la agitación de la solución, sonicación, electroporación y perfusión.

Agentes químicos

En este tipo de tratamiento, hace uso de diferentes soluciones que de igual forma tienen como objetivo solubilizar las membranas celulares provocando la eliminación del material celular. Los agentes químicos incluyen el uso de ácidos y bases, que aceleran la degradación de biomoléculas, soluciones hipertónicas e

hipotónicas, pueden causar la lisis celular⁵ por efecto osmótico⁶, y detergentes iónicos y no iónicos que solubilizan las membranas celulares [Giraldo, 2016].

Agentes biológicos

Son de dos tipos, los enzimáticos y no enzimáticos o agentes quelantes, y son aquellas sustancias orgánicas que pueden unirse covalentemente a iones metálicos formando un compuesto soluble. Las enzimas utilizadas en los tratamientos de descelularización se utilizan para romper los enlaces y las interacciones entre los ácidos nucleicos, las células que interactúan a través de proteínas vecinas y otros componentes celulares, estas enzimas proveen una alta especificidad en la remoción de residuos celulares.

⁵ Lisis celular. Es el proceso de ruptura de la membrana celular de células o bacterias que produce la salida del material celular, provocado por lisinas.

⁶ Osmótico. Que se relaciona con la osmosis.

Osmosis. Es un fenómeno físico relacionado con el movimiento de un disolvente a través de una membrana semipermeable. Tal comportamiento supone una difusión simple a través de la membrana, sin gasto de energía.

Hueso descelularizado (Nukbone®)

Nukbone® es la matriz ósea del hueso poroso de bovino proveniente del cóndilo femoral, fue elaborado con una tecnología desarrollada en el laboratorio de Biomateriales del Instituto de Investigaciones en Materiales–UNAM.

Nukbone® ha sido caracterizado fisicoquímicamente [Piña, 2006], [Piña, 2016] y biológicamente [Dávalos, 2007] y puede ser empleado como material de xenoimplante.

Anatómicamente el hueso está dividido en dos partes: fase inorgánica o mineral y fase orgánica. En la tabla 1.2, de acuerdo al anexo A, se puede observar el porcentaje de cada una de éstas fases en el Nukbone®.

Tabla 1.2. La composición del hueso está dividido en dos: fase inorgánica y fase orgánica [Gartner, 2014]. A partir de un proceso de desmineralización con una solución acuosa de HCl a 0.5M se obtuvo el porcentaje presente en el Nukbone® de cada una de estas fases.

Fases	Componentes	% de fase presente
Inorgánica o mineral	Cristales de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ Elementos traza: sodio, magnesio, calcio, fosfato.	61.767±0.891
Orgánica	Fibras de colágena tipo I, proteínas, grasa y agua.	38.233±0.891

Desmineralización

En la primera parte de esta sección se discutieron las características que debe tener el biomaterial con el cual esté elaborado un andamio para ser usado en la ingeniería de tejidos, dentro de estos biomateriales son usados los materiales de origen óseo desmineralizados, los cuales conservan su componente orgánico y porosidad, así como la interconexión de los poros, favoreciendo la migración, adhesión y proliferación celular, y por lo tanto la regeneración tisular.

Este proceso consiste en la eliminación de la mayor cantidad de minerales de biomateriales naturales, por ejemplo: hueso cortical de bovino y escamas de pescados, y de este modo aislar la colágena presente en ellos, ya que la colágena es la principal componente de la matriz extracelular en mamíferos y la ingeniería de tejidos tiene como objetivo la elaboración de andamios parecidos a la matriz extracelular de los tejidos y órganos a regenerar.

El proceso de desmineralización se logra sumergiendo el material en un agente descalcificante, por ejemplo ácidos y quelantes debido a que el material mineral es soluble en condiciones ácidas.

La concentración del agente descalcificante y el tiempo del tratamiento varían de acuerdo con el tipo de biomaterial y su tamaño. El control de la temperatura es importante, ya que acelera la velocidad de hidrólisis de la colágena.

Las ventajas que presenta este método se deben a que la desmineralización de material óseo conserva la forma e interconectividad de los poros del biomaterial, es decir; se mantiene su microestructura. De esta forma la colágena obtenida por este método no necesita de un método subsecuente que dé forma al andamio, además de tener un proceso de bajos costos, fácil manipulación y la rápida elaboración de los andamios, lo hace adecuado para situaciones de emergencia o de gran extensión.

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Reactivos

- Hueso de bovino descelularizado, *Nukbone* ®
- Ácido clorhídrico (HCl), reactivo ACS, 36.5-38%, *J.T. Baker*
- Buffer fosfato salino (PBS), pH7.4±0,2, 25°C, *MBL* ® *BION*
- Quitosano 85% desacetilado de alto peso molecular (310000-375000 Da), *Aldrich*
- Ácido acético glacial (CH₃COOH), *Baker*
- Hidróxido de sodio grado reactivo ≥ 98% anhidro (NaOH), *Sigma- Aldrich*
- Alcohol etílico absoluto (CH₃CH₂OH), *Baker*
- Agua destilada
- Agua desionizada

Materiales

- Vaso de precipitado de 200 y 500 mL Pyrex
- Matraz aforado de 50 y 100 mL
- Pipeta graduada 10 mL
- Propipeta
- Probeta graduada 50 mL
- Agitador magnético
- Disco de diamante, *Suzhou Trojan Industry Material*

Equipos

- Potenciómetro *Hanna Instruments HI223*, equipado con un electrodo *Hanna Instruments HI1131*
- Cortadora
- Parrilla eléctrica
- Horno *ECOSHEL HV-20*
- Microscopio óptico
- Microscopio electrónico de barrido *JEOL JCM-6000*
- Equipo termogravimétrico TGA Q5000IR, *TA Instruments*
- Calorímetro diferencial de barrido Q2000 , *TA Instruments*
- Espectrómetro FTIR-ATR *Bruker Alpha Platinum*
- Texturómetro *Máquina Universal Shimadzu 10kN*

PREPARACIÓN DE LAS MEMBRANAS

Desmineralización

Se eligieron muestras de Nukbone®, donadas por la empresa Biocriss (Briocriss, México) con medidas de 10mm x 10mm x 2mm, ver figura 2.1.a. La solución de ácido clorhídrico fue preparada disolviendo ácido clorhídrico fumante al 37% en agua destilada en distintas proporciones, para obtener distinta molaridad. En primera instancia se emplearon concentraciones de ácido clorhídrico muy diferentes (2M, 4M y 6M), para posteriormente, establecer un rango de concentraciones más estrecho (0.5M, 1M y 1.5M). Se colocaron las muestras en una solución de ácido clorhídrico con agitación, como en la figura 2.1.b, de modo tal que la solución de ácido clorhídrico pudiera penetrar por todos los poros de las muestras.

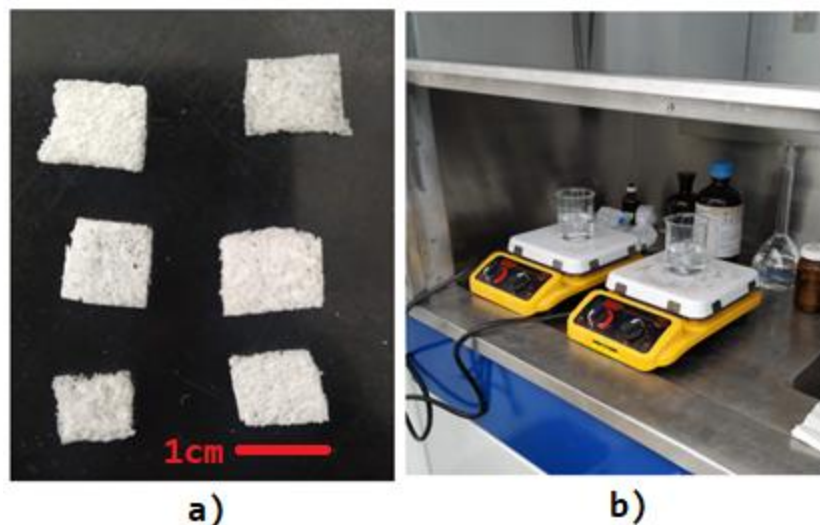


Figura 2.1. a) Se aprecian las dimensiones de las muestras de Nukbone® para realizar las pruebas fisicoquímicas para estandarizar el proceso de desmineralización. b) Montaje experimental.

Para delimitar el tiempo óptimo de desmineralización, primeramente, para las concentraciones 2M, 4M y 6M se dejaron las muestras 15, 30, 45 y 60 minutos. Mientras que en el segundo conjunto de molaridades 0.5M, 1M y 1.5M, los

tiempos de permanencia fueron más cortos, 10, 20 y 30 minutos. La notación utilizada para cada muestra es la siguiente: ***MX-Y***, donde *X* es la concentración molar de la disolución de ácido clorhídrico y *Y* el tiempo de permanencia del hueso en el ácido, teniendo así la muestra desmineralizada con un disolución acuosa de ácido clorhídrico 2M durante 10 minutos esta designada como M2-10.

Se neutralizaron las muestras con lavados con agua desionizada y el último lavado con una solución de PBS. Para la conservación de las muestras, estas se dejaron secar en un horno a 40°C por 24 horas.

Membranas

Una vez estandarizadas las variables de concentración y tiempo de desmineralización, las membranas de colágena con medidas de 15 mm x 7 mm x 5 mm, ver figura 2.2.a, fueron recubiertas superficialmente con una solución de quitosano de alto peso molecular. Las membranas fueron recubiertas La solución de quitosano fue preparada disolviendo quitosano en una solución acuosa de ácido acético glacial 2% (v/v) con 4% (m/v) de quitosano de alto peso molecular.

Para neutralizar las membranas de colágena obtenidas, se sumergieron en agitación en una solución acuosa de hidróxido de sodio, el NaOH fue disuelto en una solución acuosa de 75% de agua destilada y 25% de alcohol etílico (CH₃CH₂OH), obteniendo una solución de concentración 0.5M, en la figura 2.2.b se aprecia la consistencia de la solución de quitosano. Finalmente, una vez solidificada la membrana se secó por 24 horas a 40 °C.

La notación utilizada para cada muestra es la siguiente: ***XM-yQ***, donde *X* es la concentración molar de la disolución de ácido clorhídrico y *y* es el recubrimiento, *c* con recubrimiento de quitosano y *s* sin recubrimiento, teniendo así la muestra desmineralizada con un disolución acuosa de ácido clorhídrico 2M y recubierta con quitosano está designada como 2M-cQ.

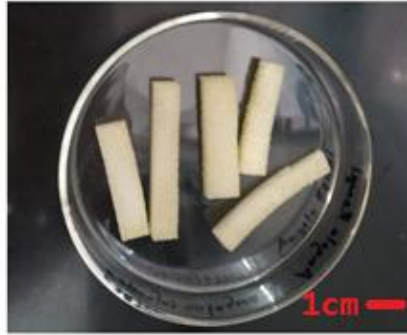


Figura 2.2. Se aprecian las dimensiones de las membranas de colágena, recubiertas superficialmente con quitosano, para realizar las pruebas mecánicas de tensión uniaxial.

Las membranas fueron caracterizadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) para estudiar la morfología y la arquitectura de los poros y termogravimetría (TGA y DSC) para estudiar su comportamiento térmico, espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para verificar las bandas correspondientes a la colágena y con pruebas mecánicas, para evaluar la respuesta de las membranas a la tensión.

Diagrama de flujo

En la figura 2.3 se muestra el diagrama de flujo para la obtención de las membranas de colágena.

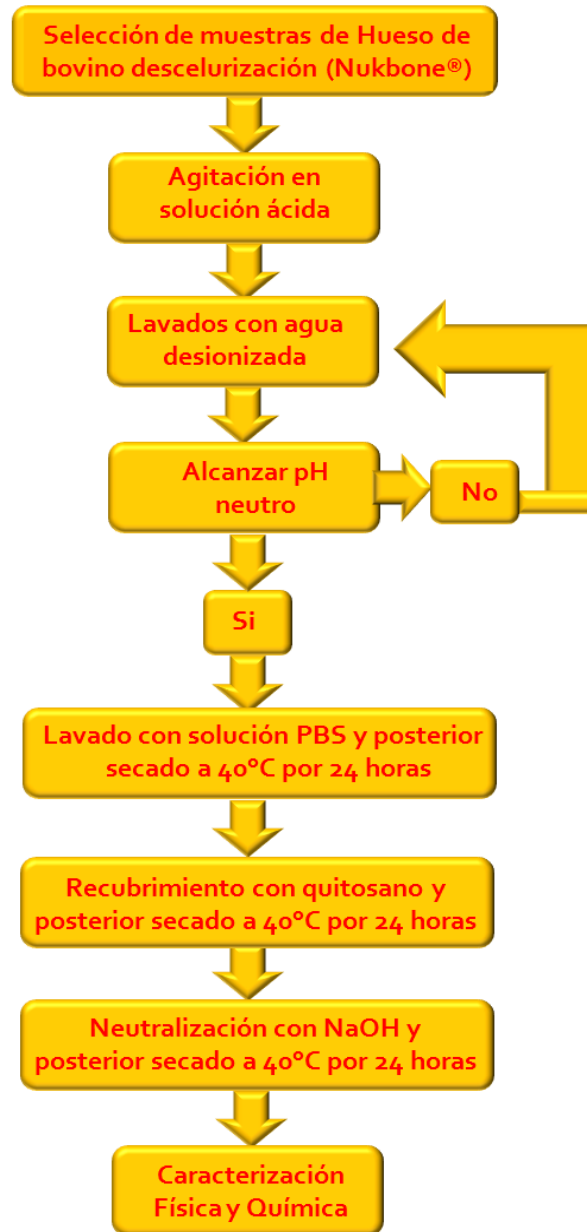


Figura 2.3 Método de obtención de membranas de colágena tipo I a partir de la desmineralización de hueso de bovino descelularizado.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DESMINERALIZACIÓN

La desmineralización del hueso descelularizado es necesaria para la liberación de las fibras de colágena, la principal reacción puede ser considerada la disolución del fosfato tricálcico para formar sal monocálcica.

Es importante considerar si el proceso de desmineralización ocurre en hueso compacto o esponjoso, para la elección de tiempos y tipos de agentes desmineralizante y concentración molar. Por ejemplo, las sales minerales tardan más en disolverse que el hueso compacto. El control de la temperatura también es importante, ya que acelera la velocidad de la hidrólisis de la colágena. En este caso la desmineralización se hizo a temperatura ambiente.

Para este trabajo se seleccionó ácido clorhídrico, debido a que los cristales de hidroxiapatita son solubles en este ácido.

A continuación, se muestran los resultados para las membranas de colágena tipo I, obtenidas de la desmineralización de hueso bovino descelularizado. Para optimizar el rango de concentraciones de ácido clorhídrico que conduce a la obtención de las membranas de colágena tipo I más adecuadas, se procedió de la siguiente manera: en primer lugar, se emplearon concentraciones de ácido clorhídrico muy diferentes (2M, 4M y 6M) para posteriormente establecer un rango de concentraciones más estrecho (0.5M - 2M) que después se estudió más detenidamente, empleando concentraciones similares (0.5M, 1M y 1.5M). Se realizaron distintas pruebas físicas y químicas para caracterizar estas membranas: microscopía electrónica de barrido (morfología superficial y EDS), análisis térmico (TGA y DSC), y espectroscopia de infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR).

Morfología superficial

A partir del proceso de desmineralización, con disoluciones de ácido clorhídrico, en una primera instancia con 2M, 4M y 6M, y posteriormente con 0.5M, 1M, 1.5M, se obtuvieron membranas de colágena tipo I.

En las micrografías tomadas con el microscopio óptico, las muestras no recibieron tratamiento previo, se aprecia que las membranas de colágena obtenidas con concentración molar mayor a 2M y tiempos superiores a 30 minutos tienden a presentar una disminución de tamaño considerable, lo que conlleva no solo a un proceso de desmineralización, o disolución de la fase mineral, sino además un proceso de degradación de la colágena (Figura 3.2). Por lo que con esta técnica de microscopia óptica se tiene que las concentraciones menores o igual a 2M con tiempos cortos de desmineralización son las variables indicadas para realizar las membranas recubiertas superficialmente con quitosano.

Dada la importancia que tiene la arquitectura de las membranas para ser un andamio exitoso para la regeneración de tejidos, se tomaron micrografías con un microscopio electrónico de barrido para observar las membranas a nivel de los poros.



Figura 3.1. Micrografía de la matriz ósea. Se aprecia la distribución y tamaño de poro.

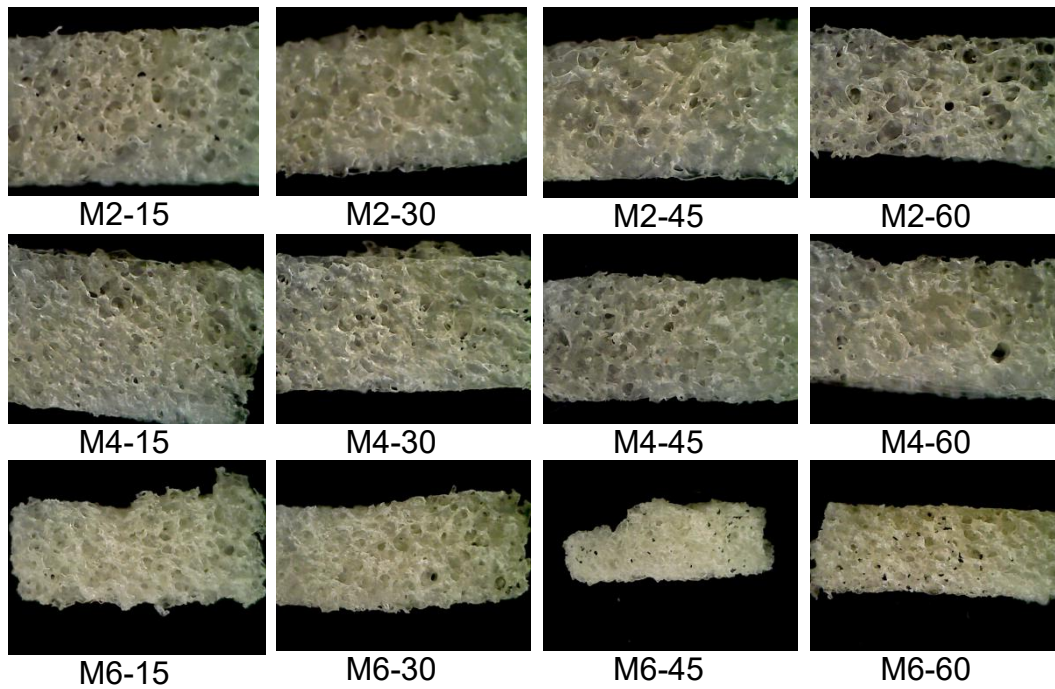


Figura 3.2 Esponjas de colágena tipo I obtenidas de la desmineralización de hueso de bovino descelularizado, con disoluciones de ácido clorhídrico al 2, 4 y 6 Molar.

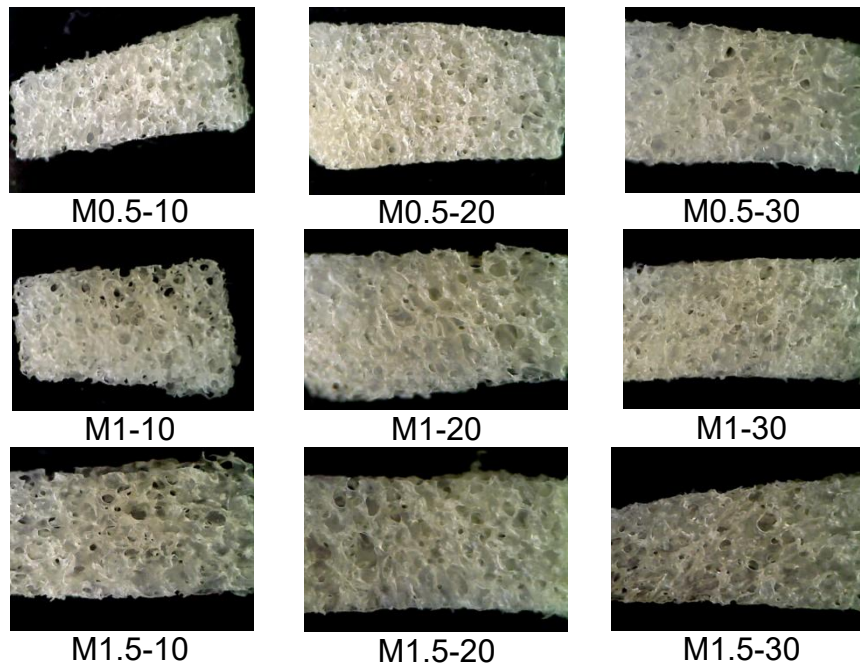


Figura 3.3 Esponjas de colágena tipo I obtenidas de la desmineralización de hueso de bovino descelularizado, con disoluciones de ácido clorhídrico al 0.5, 1, 1.5 M.

Microscopía Electrónica de Barrido

Por medio de la microscopía electrónica de barrido, haciendo uso de los electrones secundarios, para obtener estructuras tridimensionales, se tomaron las micrografías mostradas en las figuras 3.4, 3.5 y 3.6. Las muestras se cortaron de dimensiones de 10mm x 5mm x 2mm, se colocaron en los portamuestras del microscopio electrónico de barrido *JEOL JCM-6000* y no se realizó recubrimiento de oro para poder hacer el análisis elemental.

En la figura 3.4 se puede observar para la matriz ósea (Nukbone®) la apariencia pétreo correspondiente al hueso. Los poros colapsados que se observan se deben a los cortes realizados, a la matriz ósea, para la obtención de las muestras.

En las micrografías de las figuras 3.5 y 3.6 se observa la matriz ósea desmineralizada obtenida a distintas concentraciones de solución ácida y diferentes tiempos de desmineralización. Es importante señalar que cuando el proceso de desmineralización dura más de 45 minutos con una concentración mayor a 2M, siempre se observa un daño en la estructura de los poros, es decir, se observa que los poros fueron destruidos, ya que las trabéculas colapsaron.

De las micrografías se aprecia que las esponjas obtenidas a partir de la desmineralización con disoluciones con molaridad mayor a 2M, el ácido no solo disolvió la fase mineral de la matriz ósea sino también comenzó a destruir las trabéculas, por lo tanto, colapsaron los poros. Se observa una pérdida de la arquitectura original, ya que los poros se destruyeron o colapsaron las trabéculas que los conforman.

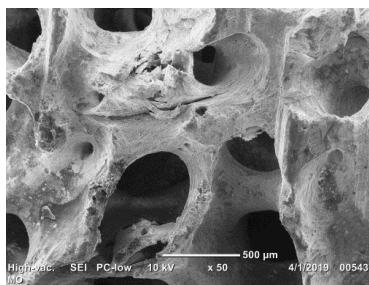


Figura3.4. Micrografía de la matriz ósea.

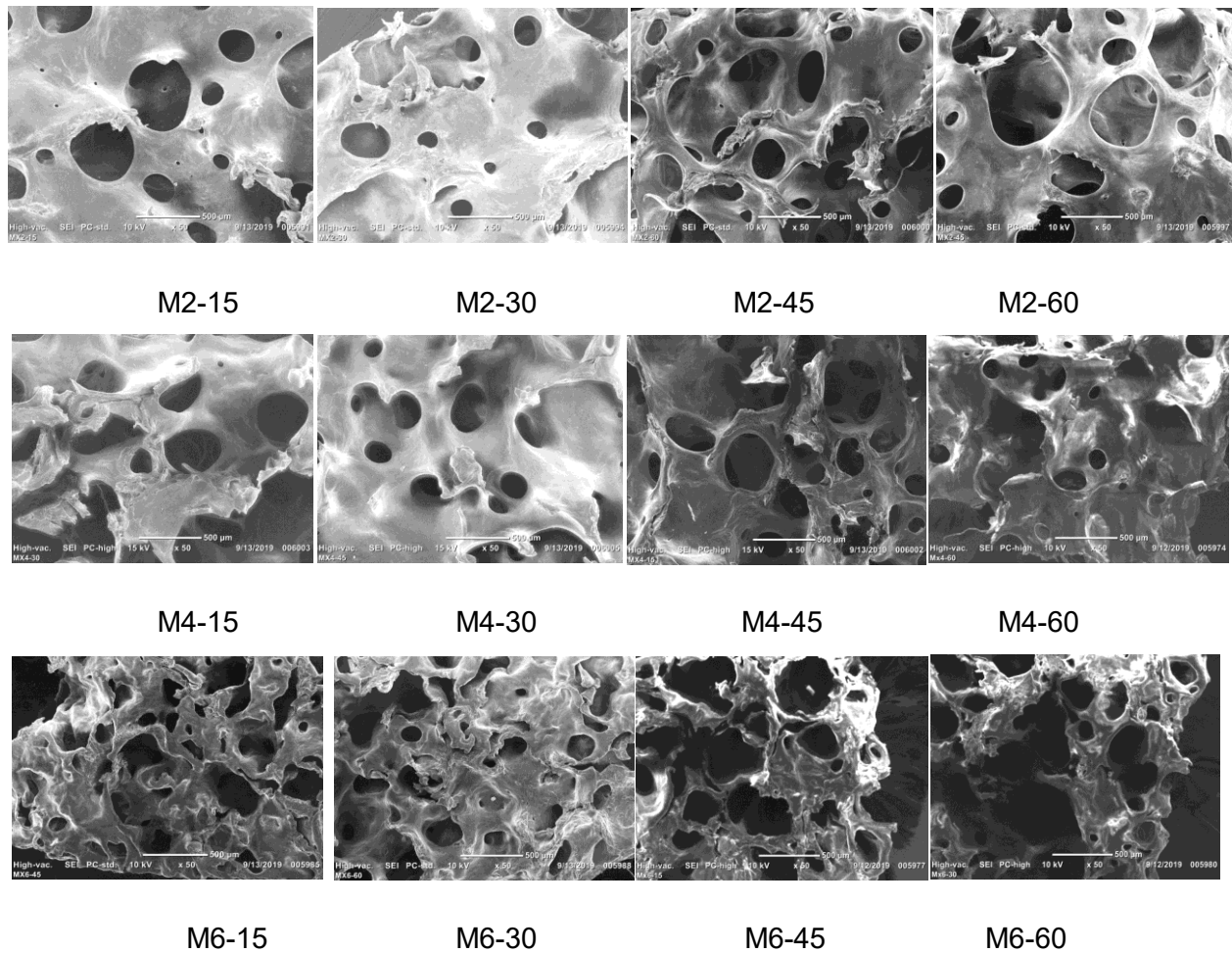


Figura 3.5 Esponjas de colágena tipo I obtenidas de la desmineralización de hueso de bovino descelsularizado con disoluciones de ácido clorhídrico al 2, 4 y 6M, a un aumento de x50.

Para el caso de una disolución menor a 2M y tiempos cortos se observa que se conservan las trabéculas, así como los poros después del proceso de desmineralización, y esta morfología es la encargada de la proliferación celular del andamio. Por otro lado, los poros se mantuvieron intactos, es decir, no colapsaron y mantuvieron la misma estructura de la matriz ósea (figura 3.1), así como la interconexión de los poros cuando el proceso de desmineralización se hizo con disoluciones menores a 2M. Teniendo así, desde el punto de vista morfológico, una desmineralización exitosa, debido a que no se afectó la estructura de la matriz ósea ante el proceso de desmineralización con molaridades menores a 2M.

Por lo tanto, morfológicamente es conveniente usar una disolución de ácido clorhídrico menor a 2M y con tiempos no mayores a 20 minutos, para preservar la microarquitectura del hueso de bovino descelularizado.

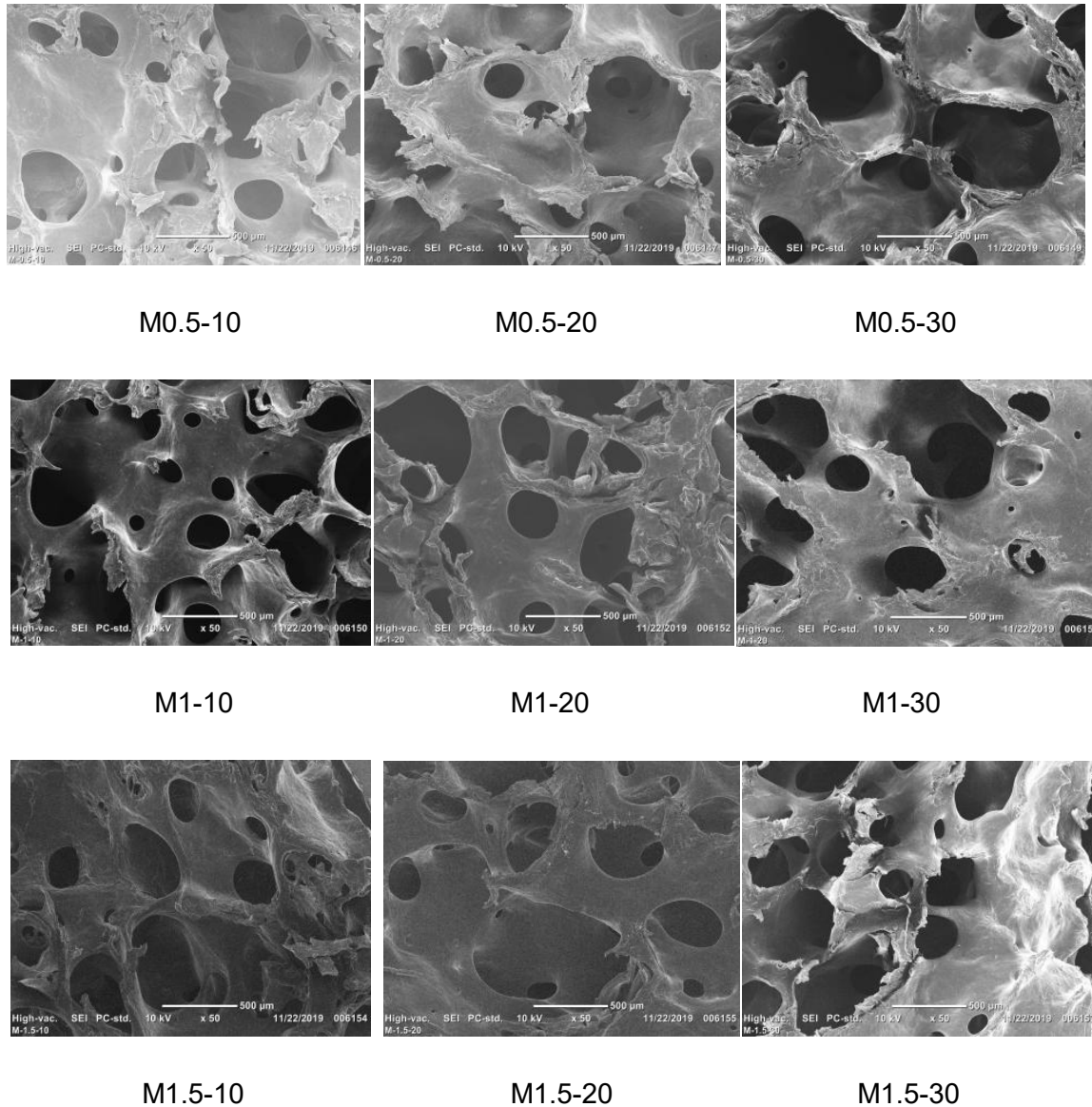


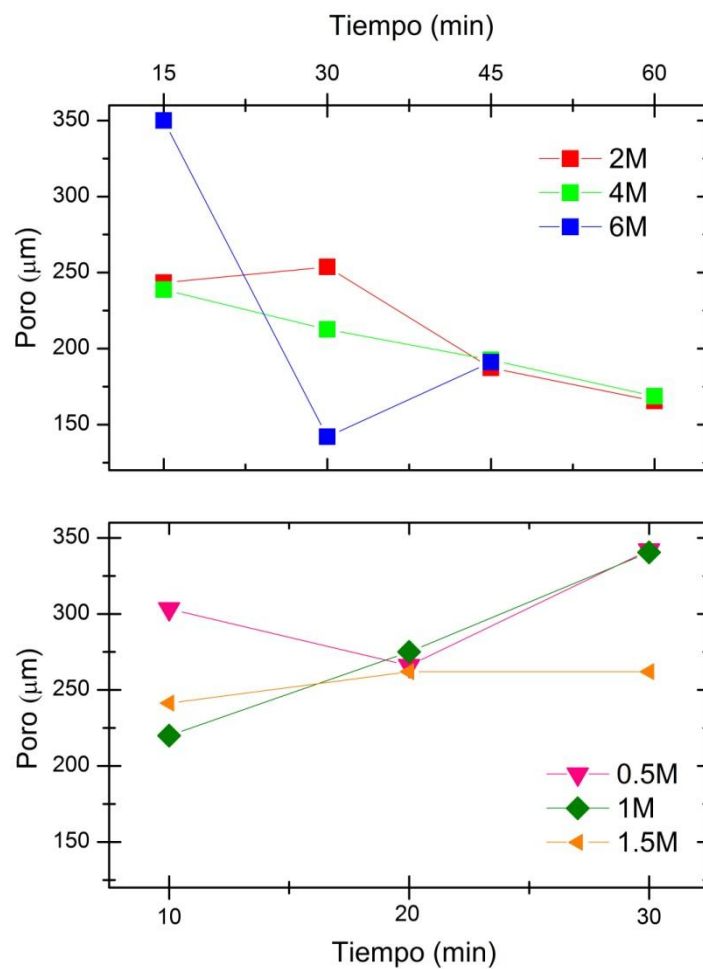
Figura 3.6 Esponjas de colágeno tipo I obtenidas de la desmineralización de hueso de bovino descelularizado con disoluciones de ácido clorhídrico al 0,5, 1 y 1.5M, a un aumento de x50.

Tamaño de poro

Cuando se habla de biomateriales es importante tomar en cuenta el tamaño de poro del material, para la viabilidad celular, es por eso que a partir de las micrográficas obtenidas de las distintas membranas con el programa del microscopio electrónico de barrido (*JEOL JCM-6000*) se midió el diámetro de los poros observados y del análisis estadístico (desviación estándar) de los triplicados se obtuvo la gráfica 3.1 en la que se observa que con este proceso de desmineralización se tiene un tamaño de poro promedio de $246.77 \pm 14.69 \mu\text{m}$ (de diámetro). Hay que hacer notar que cada punto en la gráfica es el promedio de tamaño para cada concentración y tiempo de desmineralización.

Debido a que las células más abundantes presentes en la dermis son los fibroblastos [Gartner, 2014], y estos tienen un tamaño que varía entre 50 y 100 μm , con los tamaños de poro obtenidos es posible que los fibroblastos puedan migrar, adherirse y proliferar, además del flujo de nutrientes esenciales para las células.

A demás, en la gráfica 3.1 se observa que hubo menor dispersión de los valores para las concentraciones menores a 2M, por lo que con este estudio se eligen nuevamente concentraciones menores o iguales a 2M y tiempos cortos para el proceso de desmineralización.



Gráfica 3.1. Tamaño de poro promedio de las membranas obtenidas a diferentes concentraciones molares de HCl y a distintos tiempos de desmineralización.

Análisis Elemental (EDS)

Por medio de microscopia electrónica de barrido, haciendo uso de espectroscopia de rayos X por energía dispersiva (por sus siglas en inglés, EDS) que se generan en una muestra sometida a bombardeo electrónico es posible identificar los elementos presentes y establecer su concentración.

En las tablas 3.1 y 3.2, se observan los elementos presentes que se buscaron y la concentración en porcentaje de masa presente. Para la matriz ósea, se analizaron carbono, oxígeno, calcio y fósforo, ya que son los elementos presentes en la fase mineral, hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). El hecho de que el oxígeno sea el elemento con mayor porcentaje en masa es porque se encuentra presente tanto en la parte orgánica como en la parte inorgánica de la muestra.

Para las muestras óseas desmineralizadas se analizaron carbono, oxígeno, calcio, fósforo, nuevamente, y se agregaron cloro y potasio. El cloro se analizó para comprobar que fueron eficientes los lavados con agua desionizada para retirar el ácido clorhídrico de las membranas. De acuerdo a los datos de las tablas 3.1 y 3.2, se puede decir que en la superficie no se encontró una cantidad significativa de cloro (menos del 0.5%) por lo tanto los lavados con agua desionizada y PBS fueron efectivos. La presencia del porcentaje de masa del calcio fue muy baja, menor al 1%, lo cual confirma que el mayor porcentaje de masa de la muestra corresponde a la parte orgánica. Con el estudio de EDS nos es posible asegurar:

- El proceso de desmineralización es eficiente, se tiene un porcentaje menor al 0.5% de calcio en la superficie de las muestras.
- Los lavados con agua desionizada, en efecto, retiran el ácido clorhídrico de las muestras.

Tabla 3.1. Contenido porcentual de C, O, Ca, P, Cl y K en la superficie de las membranas sometidas a diferentes tiempos de desmineralización para una concentración molar mayor a 2M.

Muestra	%C	%O	%Ca	%P	%Cl	%K	%Total
M0-00	26.50	67.20	6.02	0.28	-----	-----	100
M2-15	56.70	43.11	0	0.04	0.02	0.06	100
M2-30	55.17	44.01	0.03	0.34	0.32	0.12	100
M2-45	56.77	43.14	0	0	0.05	0.04	100
M2-60	62.16	37.41	0	0	0.36	0.07	100
M4-15	53.28	45.43	0.53	0	0.04	0.72	100
M4-30	54.29	45.43	0	0	0.27	0	100
M4-45	44.50	43.30	5.17	0	7.02	0	100
M4-60	63.92	34.59	0	0	1.19	0.29	100
M6-15	56.31	43.36	0	0	0.32	0	100
M6-30	56.10	43.39	0.08	0	0.42	0.02	100
M6-45	59.11	40.73	0	0	0.11	0.05	100
M6-60	59.90	38.87	0	0.22	0.98	0.02	100

En el caso donde hubo mayor presencia de calcio y cloro, muestra M4-45 se debe a que los lavados no fueron eficientes y se formó cloruro de calcio (CaCl_2) a partir de estos elementos remanentes.

Tabla 3.2. Análisis elemental, obtenido por EDS, de la superficie de las membranas desmineralizadas a diferentes tiempos para una concentración molar menor a 2M.

Muestra	%C	%O	%Ca	%P	%Cl	%K	%Total
M0.5-10	61.93	37.52	0	0	0.56	0	100
M0.5-20	58.04	41.14	0	0.10	0.48	0.24	100
M0.5-30	54.51	45.42	0	0	0	0.06	100
M1-10	56.48	43.17	0.05	0.04	0.04	0.04	100
M1-20	59.82	39.41	0.14	0	0.60	0.04	100
M1-30	58.37	41.34	0.02	0	0.26	0	100
M1.5-10	61.74	37.86	0	0	0.40	0	100
M1.5-20	60.37	38.86	0.05	0.13	0.58	0	100
M1.5-30	59.98	39.39	0.06	0	0.56	0	100

Con este estudio de forma cuantitativa se observa el cambio porcentual de cantidad mineral y orgánica en las muestras desmineralizadas, y que las muestras desmineralizadas con ambas concentraciones y diferentes tiempos presentan cantidades de fase orgánica y mineral parecidas.

Análisis Térmicos

Análisis Termogravimétrico

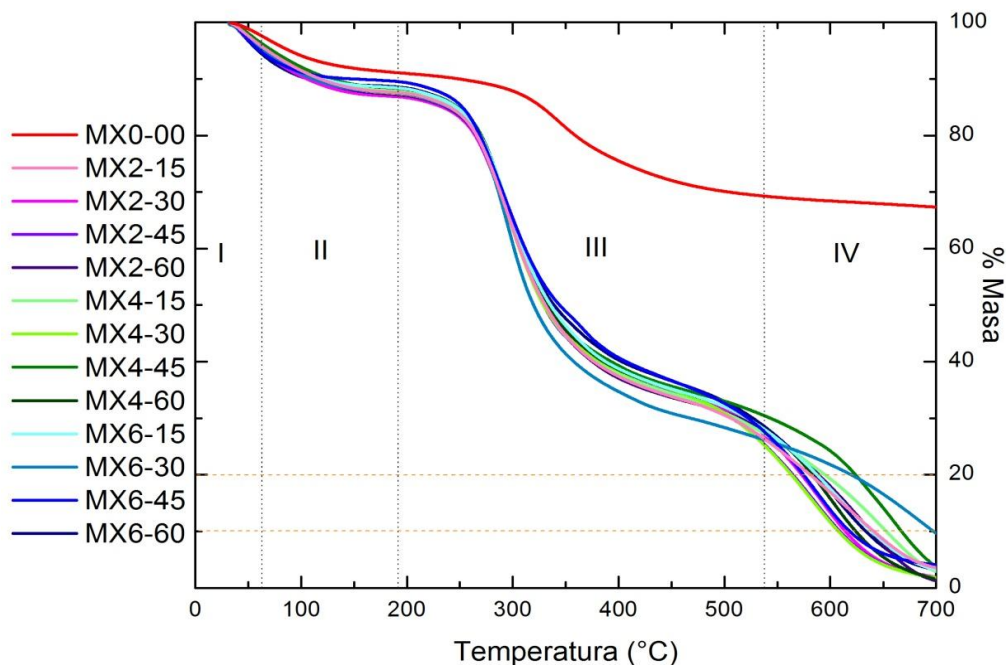
El análisis termogravimétrico mide la masa (pérdida o ganancia) de una muestra cuando ésta se somete a un programa controlado de temperatura. Por esta técnica puede determinarse el porcentaje de pérdida de peso por descomposición, por deshidratación, por pérdida de disolvente, etc. También puede determinarse la estabilidad térmica.

Para el análisis termogravimétrico se usaron muestras de 5-10 mg sin tratamientos previos y el estudio se realizó en un intervalo de temperaturas de 25°C hasta 700°C, a una velocidad de calentamiento de 10°C/min con una atmosfera de N₂, para controlar mejor las condiciones del estudio. El análisis se realizó en un Equipo termogravimétrico TGA Q5000IR (TA Instruments). Para el análisis de los resultados se utilizó el programa Origin Pro 8©.

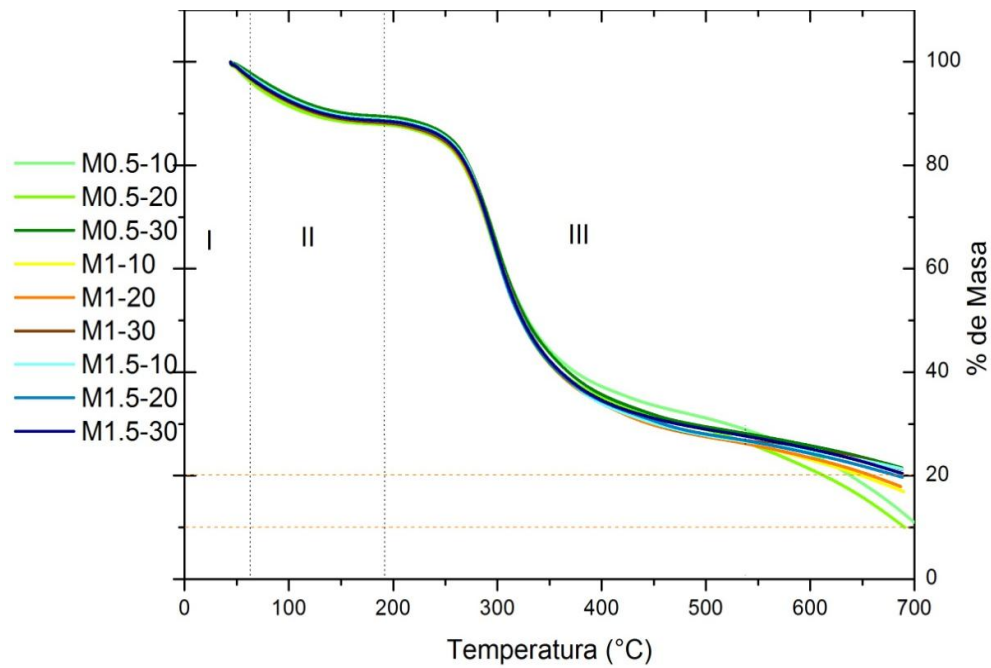
En la gráfica 3.2 y 3.3 se pueden identificar tres regiones. La primera de ellas se observa de 25°C a 50°C, tanto para la matriz ósea como para las distintas membranas, y corresponde a la deshidratación de la colágena. Mientras que la segunda bajada de la curva, la segunda región alrededor de los 50°C hasta los 250°C, que puede estar asociada al proceso de desnaturalización de la colágena, es decir, al desdoblamiento de la triple hélice α . Y en la tercera región, por arriba de los 250°C se presenta la degradación de la colágena. A estas temperaturas las fibrillas que forman al colágeno tipo I que ya se encuentran desenredadas comienzan a romperse. Es en la segunda y tercera zonas en la que se presenta la mayor diferencia entre la matriz ósea y las membranas obtenidas, ya que las trabéculas de las muestras desmineralizadas se encuentran desprovistas de la fase mineral.

La curva en color rojo corresponde a la matriz ósea, en la gráfica 3.2, a los 700°C tiene un porcentaje en masa del 70% aproximadamente, es decir, se degradó alrededor del 30% de muestra, lo equivalente a la parte orgánica presente en el Nukbone ®. Las demás curvas corresponden al análisis termogravimétrico de las

membranas con distintos parámetros de concentración molar y tiempo de desmineralización. Para las muestras desmineralizadas se observa que la mayor pérdida de masa se presenta desde los 250°C hasta los 500°C y está relacionada con la combustión de la colágena [León, 2016]. En cuanto a la región que comprende los 500° hasta los 700°C, las muestras desmineralizadas con una concentración mayor a 2M presentaron una pérdida de masa de más del 90%, mientras que las muestras desmineralizadas con una concentración menor a 2M la pérdida de masa fue alrededor del 80%. Ya que con una concentración y tiempo mayor quedan más fibras de colágena expuestas por lo que a esas temperaturas quedo un porcentaje de fase mineral menor al 5%.



Gráfica 3.2. Estudio termogravimétrico de las muestras desmineralizadas con una disolución mayor a 2M.



Gráfica 3.3. Comportamiento termogravimétrico de las muestras desmineralizadas con una disolución menor a 2M.

Del estudio termogravimétrico las variables que se seleccionaron para los próximos estudios son las muestras con concentración menor o igual a 2M y con tiempos cortos, debido a que presentan un comportamiento menos disperso en la región III con lo que se tiene un mejor control de la temperatura a la que se degrada aproximadamente el 80% de cada muestra.

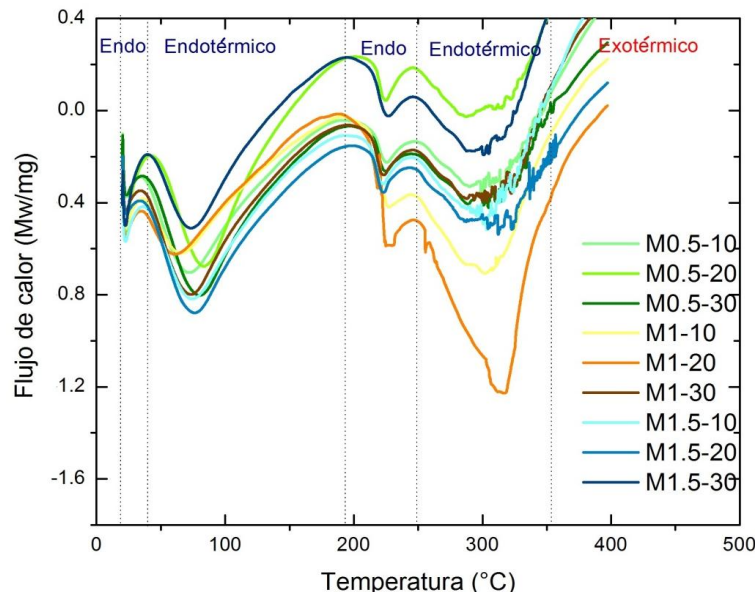
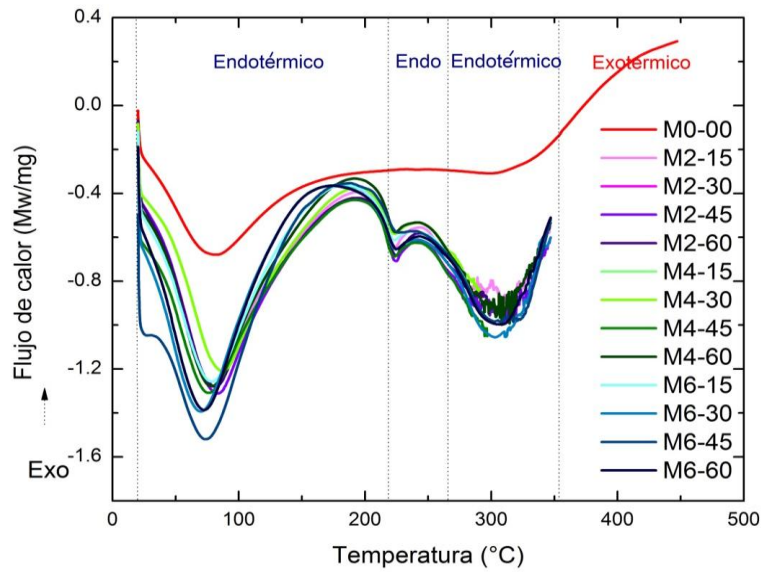
Calorimetría Diferencial de Barrido

La calorimetría diferencial de barrido proporciona información sobre los efectos térmicos, los cuales son caracterizados por un cambio en la entalpía y por un intervalo de temperatura cuando la muestra se calienta o se enfría. Dichos cambios comprenden: fusión, cristalización, ebullición, sublimación, transiciones vítreas, transformaciones polimórficas, entalpías de fusión, capacidad calorífica, etc.

Se realizó un análisis de calorimetría diferencial de barrido a la matriz ósea y a las membranas obtenidas, nuevamente se usaron muestras de 5-10 mg y el análisis se hizo desde los 20°C hasta 450°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min, con una atmósfera de N₂. El estudio se llevó a cabo en un Calorímetro diferencial de barrido Q200 (TA Instruments). El análisis de resultados se realizó con el programa Origin Pro 8 ©.

Para las distintas concentraciones molares se aprecia un comportamiento parecido ver gráfica 3.4, tres o cuatro procesos endotérmicos asociados a la desnaturalización de la colágena y un pico exotérmico debido a la combustión de la colágena.

El primer pico endotérmico, entre 25°C y 50°C corresponde a la pérdida de agua, en algunas muestras este pico se superpone con el siguiente pico endotérmico que ocurre entre los 50°C y los 200°C que se asocia al desdoblamiento de la triple hélice. El segundo pico endotérmico, de 200°C a 250°C, se atribuye al desdoblamiento de la hélice levógira de la colágena. En cuanto al tercer pico endotérmico, que aparece entre los 250°C y 350°C puede deberse a la ruptura de las cadenas α y a cavitaciones provocadas porque se inicia la combustión de la colágena. Finalmente por arriba de los 350°C se observa la tendencia de un pico exotérmico debido a la combustión de la colágena, este pico exotérmico se relaciona con la mayor pérdida de masa observada en los termogramas. El estudio no se realizó a una temperatura mayor para evitar daños en el aparato.



Gráfica 3.4. Arriba. Estudio calorimetría Diferencial de Barrido de las muestras desmineralizadas con una disolución mayor a 2M. Abajo. Muestras desmineralizadas con una disolución menor a 2M. En ambas gráficas se aprecia la presencia distintas temperaturas de desnaturalización y degradación de la colágena (después de los 300°C).

Con la calorimetría diferencial de barrido se seleccionaron para los próximos estudios son las muestras con concentración menor o igual a 2M y con tiempos cortos, debido a que presentan la temperatura de desnaturalización a una temperatura mayor. Esto se debe a que la parte mineral remanente estabiliza térmicamente a las esponjas.

Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Esta técnica estudia los fenómenos de la interacción entre la radiación de origen infrarrojo y la materia. Esta interacción puede ser a nivel atómico y molecular. Esencialmente la energía de radiación, localizada en determinada longitud de onda del infrarrojo, es absorbida por una molécula (o parte de ella) que se encuentra vibrando en su estado basal a la misma longitud de onda que la radiación infrarroja incidente, provocando con ello un cambio en la intensidad de la vibración.

El resultado de la interacción proporciona información útil sobre el sistema estudiado con relación a su estructura molecular.

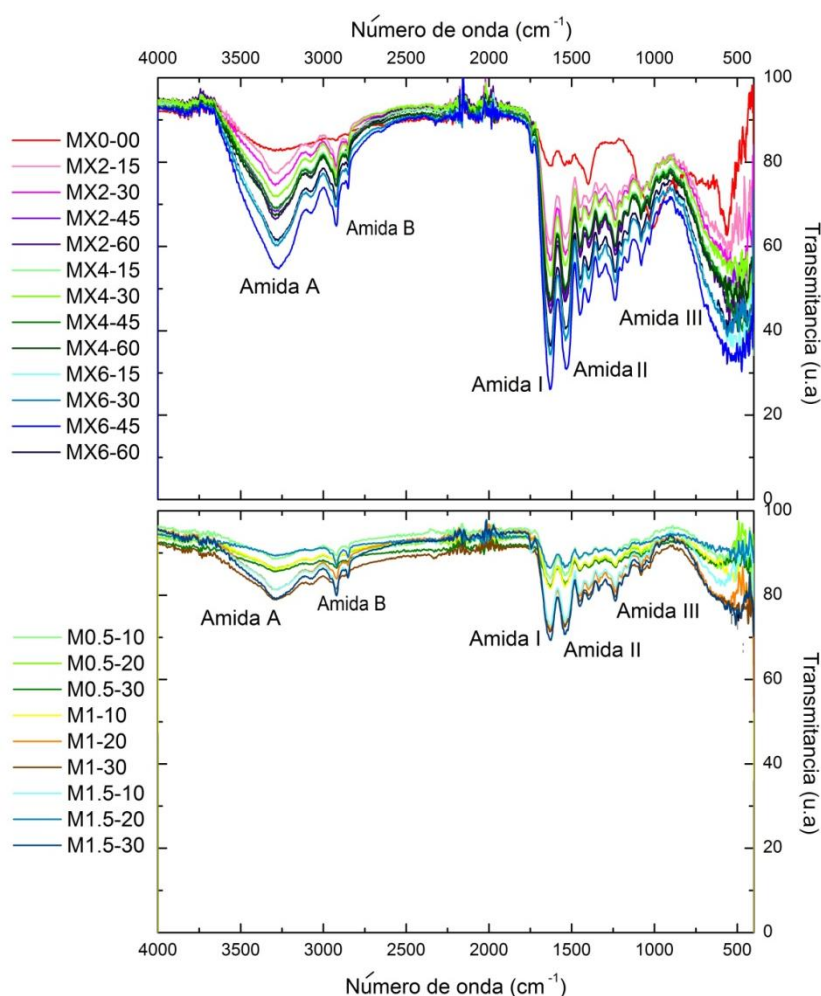
Esta técnica proporciona un espectro de reflexión de las bandas de los grupos funcionales de las sustancias inorgánicas y orgánicas, por lo cual es posible realizar una confirmación de los materiales presentes en la muestras de estudio.

La espectroscopia de absorción infrarroja (IR), es por lo tanto, el método utilizado para determinar las estructuras de moléculas con características de absorción de la radiación infrarroja según su vibración molecular. La región IR va de 12 800 a 10 cm^{-1} y se puede dividir en la región de IR cercano (NIR) ($12\ 800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$), IR medio ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) e IR lejano o FAR-IR ($400\text{-}50\text{ cm}^{-1}$). El espectro vibracional de una molécula se considera una propiedad física única y por tanto característica de esta molécula. Así, entre otras aplicaciones, el espectro IR se puede usar como “huella dactilar” en la identificación de muestras desconocidas mediante la comparación con espectros de referencia.

Para este estudio las muestras se cortaron de cubos de lado, sin tratamientos previos. El estudio se llevó a cabo en el Espectrómetro FTIR-ATR *Bruker Alpha Platinum*, a temperatura y presión ambiente, en un intervalo de longitud de onda de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$.

Los espectros de infrarrojo de las diferentes membranas se muestran en la gráfica 3.5. Se pueden observar las cinco bandas de absorción características de la

colágena. La banda de la amida I ($1660-1650$ y 1630cm^{-1}) se origina a partir de las vibraciones de estiramiento C=O acopladas a vibraciones de flexión N-H. La amida II (1537 cm^{-1}) surge debido a las vibraciones de flexión N-H acopladas a vibraciones de estiramiento C-N. La amida III (1235 cm^{-1}) representa la combinación de picos entre las vibraciones de estiramiento C-N y flexión N-H. La otra banda surge a partir de las vibraciones de estiramiento N-H (3305 cm^{-1}) [Ungureanu, 2015]. Al estar presentes estas 5 bandas este estudio nos indica que las membranas están compuestas de colágena.



Gráfica 3.5. Arriba. Estudio de espectrometría de infrarrojo por transformadas de Fourier de las muestras desmineralizadas con una disolución mayor a 2M. Abajo. Muestras desmineralizadas con una disolución menor a 2M. En ambas gráficas se aprecian las bandas correspondientes a los grupos presentes en la colágena.

MEMBRANAS DE COLÁGENA TIPO I

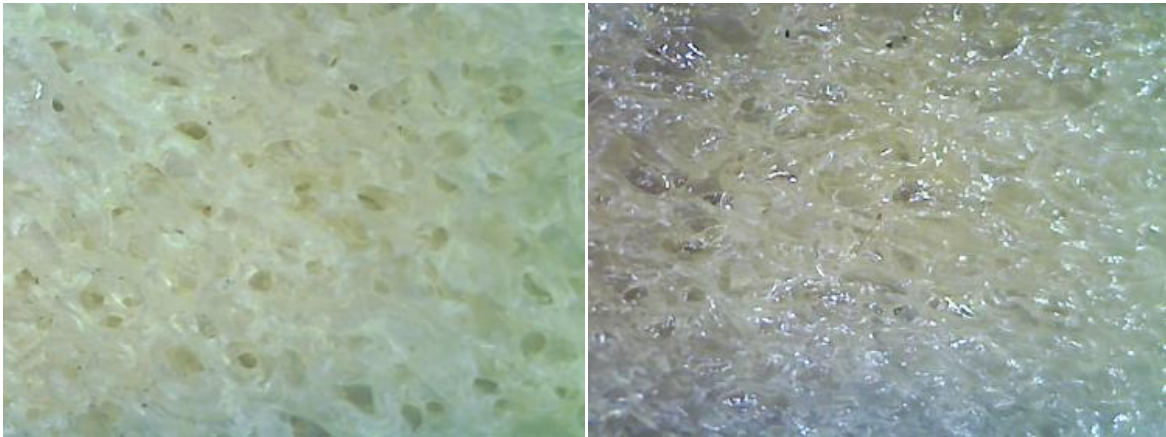
De la caracterización hecha previamente se eligieron los parámetros óptimos de concentraciones de ácido clorhídrico y tiempo de desmineralización. Los valores elegidos fueron 0.5M y 2M, se tomaron el valor mínimo y máximo con el que se presentaron las condiciones más adecuadas para este trabajo, y en futuros estudios de cultivo celular observa como esta diferencia de fase mineral afecta a las células. Por otro lado, el tiempo de desmineralización se fijó en 10 minutos, para unificar ésta variable, y obtener un método rápido de obtención de membranas de colágena.

Las membranas se recubrieron con quitosano para crear una cubierta superficial, es decir se barnizaron solo en una cara, y de esta forma hacer una capa de barrera antimicrobiana en las membranas. La solución de quitosano fue preparada disolviendo quitosano en una solución acuosa de ácido acético glacial 2% (v/v) con 4% (m/v) de quitosano de alto peso molecular. Se realizaron distintas pruebas físicas y químicas para caracterizar estas membranas: microscopia electrónica de barrido (morfología superficial y composición química superficial, EDS), análisis térmico (TGA y DSC) y espectroscopia de infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR), además de realizar pruebas mecánicas de tensión uniaxial. Todas las pruebas se realizaron por triplicado (Anexo B).

Morfología superficial

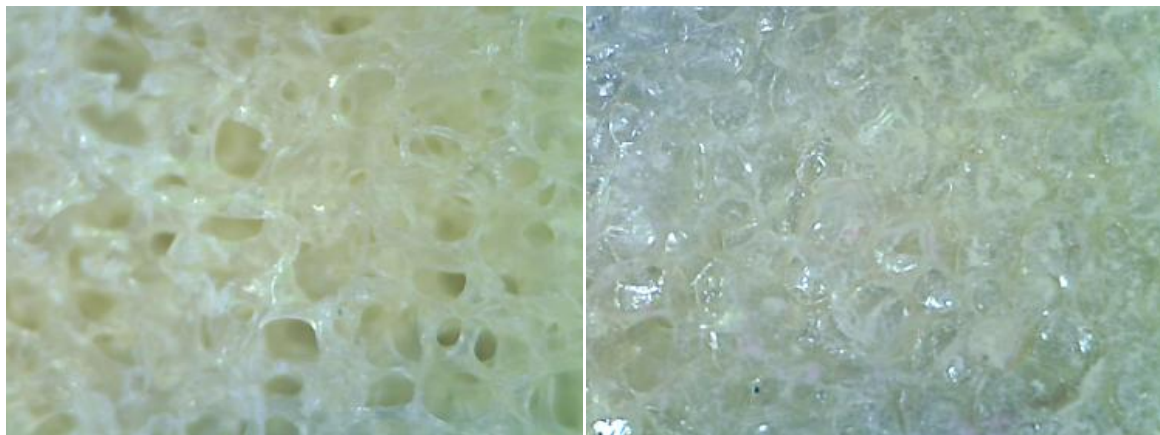
Una vez obtenidas las membranas se observaron con el microscopio óptico (las muestras no recibieron tratamiento previo) antes y después de ser recubiertas con quitosano, las muestras no recibieron tratamiento previo. Se puede observar que se conservó la microarquitectura del Nukbone® (ver figura 3.7) en las membranas antes de ser recubiertas con la solución de quitosano, es decir, se conservaron los poros así como la distribución de estos. La estructura de poros interconectados y la distribución de poros son características esenciales para garantizar la penetración y difusión adecuada de nutrientes dentro de la membrana, para poder lograr una vascularización en el andamio y, además, para que las células puedan generar su propia matriz extracelular [Miguel, 2019].

En cuanto a las membranas recubiertas superficialmente, se observa como el quitosano funciona como una barrera que cumpliría la función de impedir que agentes externos puedan entrar a través de los poros de la membrana hacia el interior del cuerpo. Con el microscopio óptico se aprecia que los poros por debajo de esta capa se encuentran en las condiciones necesarias para una posible adhesión y proliferación celular.



0.5M-sQ

0.5M-cQ



2M-sQ

2M-cQ

Figura 3.7 Superficie de las membranas de colágena tipo I antes y después de ser recubiertas con quitosano. Se aprecia que los poros se sellaron y se mantuvo intacta la morfología de la matriz ósea.

Microscopía Electrónica de Barrido

Para éste estudio las muestras se cortaron de dimensiones de 10mm x 7mm x 5mm, se colocaron en los portamuestras del microscopio electrónico de barrido *JEOL JCM-6000* y no se realizó recubrimiento de oro para poder hacer el análisis elemental.

En las siguientes micrografías de las figuras 3.8 puede observar con un aumento de 22K y 24K la superficie de las membranas recubiertas con quitosano. Con la microscopia electrónica se puede apreciar que la mayoría de los poros en ambas membranas se sellaron. En la muestra 2M-cQ se aprecia que algunos poros no fueron recubiertos, por lo que se tomaron otras micrografías con aumento de 50K para verificar si el tamaño de los poros disminuyó, figura 3.10.

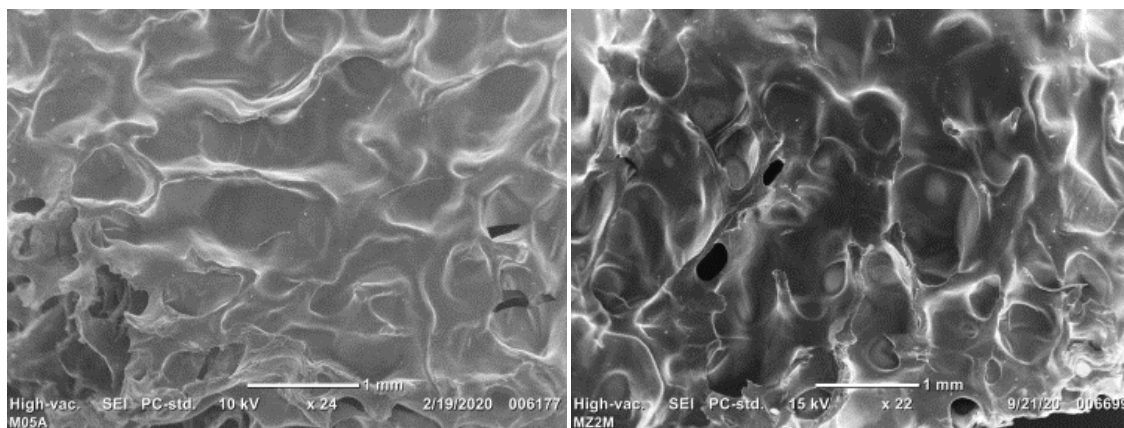


Figura 3.8 Micrografías de las membranas obtenidas con una molaridad de 0.5M y 2M, respectivamente. Con el microscopio electrónico se aprecia que la mayoría de los poros en las membranas fueron recubiertos con el quitosano.

En la figura 3.9 se muestra la micrografía a 200K de aumento y se aprecian las trabéculas de los poros en las membranas antes y después del recubrimiento. En la membrana que no tiene recubrimiento se observa una superficie rugosa y de aspecto fibrosa debido a que casi el 80% de la membrana está conformada por colágena tipo I. Mientras que en la membrana recubierta se observa la misma estructura de las trabéculas, aunque tiene un aspecto liso proporcionado por el quitosano. A este aumento se alcanza a verificar que en efecto los poros se encuentran sellados por completo.

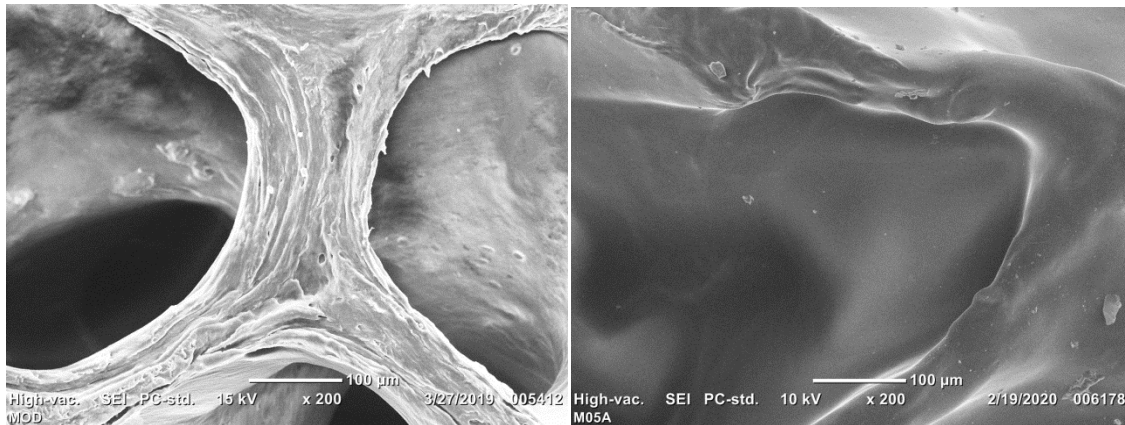


Figura 3.9 Morfología de las trabéculas en las membranas antes (izquierda) y después (derecha) de ser recubiertas con quitosano.

Tamaño de poro

Con el programa del microscopio electrónico de barrido (*JEOL JCM-6000*) se midió el diámetro de los poros observados y se hizo un análisis estadístico (desviación estándar) de los triplicados

Se observa en la figura 3.10 las micrografías a 50K de aumento, en ellas se aprecia que la superficie de las membranas se encuentra sellada, por la excepción de algunos poros que no se sellaron por completo, por lo que se tomó el tamaño de estos poros teniendo un tamaño promedio de poro de $163.33 \pm 21.54 \mu\text{m}$, de lo que se infiere que los poros que no fueron recubiertos totalmente, esto debido a un proceso ineficiente de recubrimiento. Aunque éstos sí disminuyeron su tamaño, ya que en las membranas no recubiertas se obtuvo un promedio de tamaño de poro de $246.77 \pm 14.69 \mu\text{m}$.

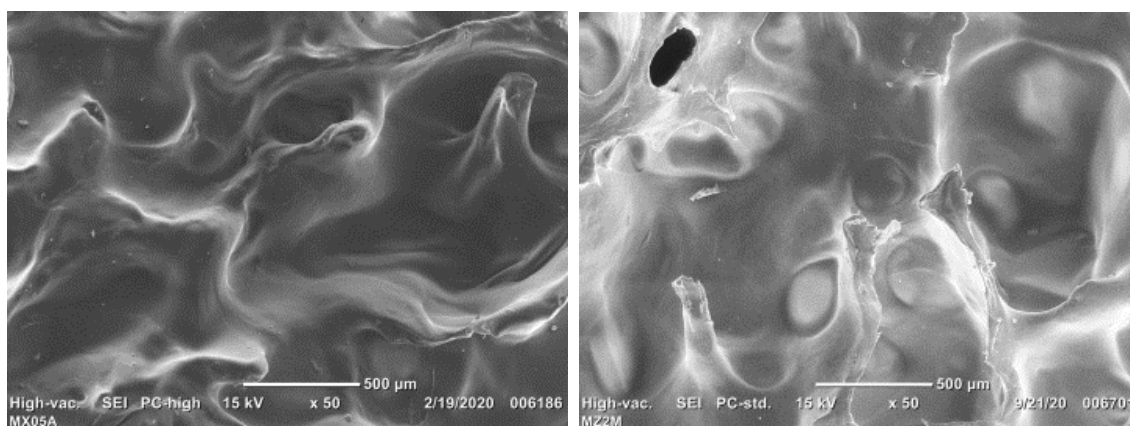


Figura 3.10 Micrografías de las membranas de colágena tipo I, a un aumento de 50K, con este aumento se aprecia una superficie lisa y sellada, características obtenidas por el recubrimiento de quitosano.

Análisis Elemental (EDS)

Se tomó el análisis elemental de la superficie de las membranas antes y después de ser recubiertas. Los elementos analizados fueron carbono, oxígeno, calcio, fósforo, cloro y sodio, este último se agregó ya que las membranas fueron neutralizadas con NaOH.

Nuevamente se obtuvo que aproximadamente el 99% de la superficie está compuesta por carbono y oxígeno, el 1% restante está conformado por elementos traza en su mayoría formado por cloro y fósforo, ver tabla 3.3. Esto verifica que los lavados, con agua desionizada y PBS, para retirar el ácido clorhídrico son eficientes.

Por otra parte, en las membranas recubiertas con quitosano se analizó la presencia de sodio, por ser neutralizadas con NaOH, y el estudio no detectó contenido de sodio en ninguna de las membranas. En este caso los lavados también resultaron eficientes para eliminar el hidróxido de sodio.

Tabla 3.3. Contenido porcentual de C, O, Ca, P, Cl y K en la superficie de las membranas sometidas a diferentes tiempos de desmineralización para una concentración molar 0.5M y 2M. Todas las muestras fueron recubiertas con quitosano y neutralizadas con NaOH.

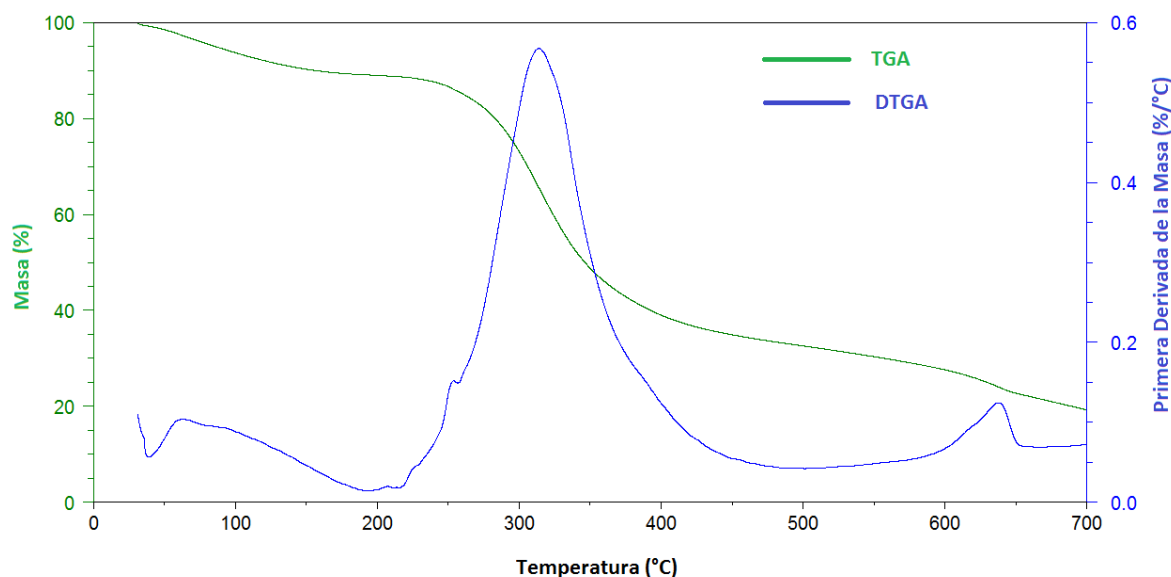
Muestra	% C	%O	%Ca	%P	%Cl	%Na
0.5M-sQ	61.93	37.52	0	0	0.56	--
2M-sQ	56.70	43.11	0	0.04	0.02	--
0.5M-cQ	53.677±1.576	45.297±1.405	--	--	0.727±0.387	--
2M-cQ	54.960±0.339	44.665±0.392	--	0.025±0.004	0.105±0.018	--

Análisis Térmicos

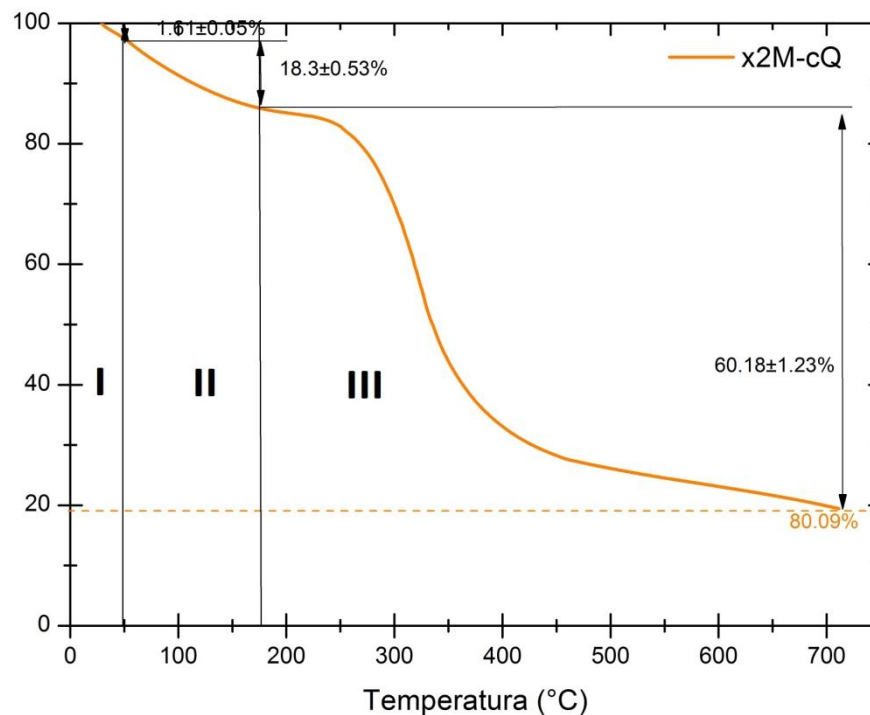
Análisis Termogravimétrico

Para el estudio termogravimétrico se usaron muestras de 5-10 mg sin tratamientos previos y el estudio se realizó en un intervalo de temperaturas de 25°C hasta 700°C, a una velocidad de calentamiento de 10°C/min, A esta velocidad la colágena tipo I presenta mayor estabilidad [Gómez, 2010], con una atmosfera de N₂, para controlar mejor las condiciones del estudio. El análisis se realizó en un Equipo termogravimétrico TGA Q5000IR (TA Instruments). Para el análisis de los resultados se utilizó el programa Origin Pro 8 y el programa TA Universal Analysis ©.

El análisis termogravimétrico a través de la curva de variación de peso (TGA) y su primera derivada (DTGA) evalúa la pérdida de peso cuando una muestra es sometida a una rampa de temperatura. En la gráfica 3.6, se observa tanto el comportamiento termogravimétrico como el de la primera derivada de la muestra 0.5M-cQ.

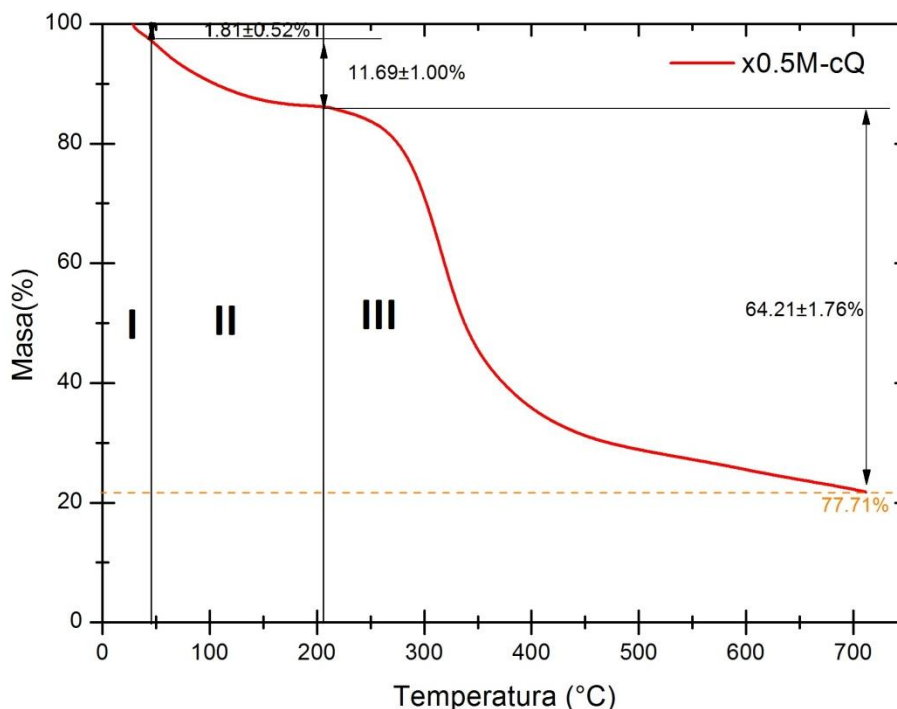


Gráfica 3.6. Termograma de la membrana 0.5M-cQ a una rampa de calentamiento de 10min/°C. Se observan 3 regiones de pérdida de masa y con el DTGA fue posible identificar las temperaturas asociadas a esas regiones.



Grafica 3.7. Comportamiento termogravimétrico a una rampa de calentamiento de 10min/°C de la muestra x2M-cQ. Se observan 3 regiones de pérdida de masa.

Se observa tres regiones en los termogramas (Gráficas 3.7 y 3.8). La primera región que se encuentra por debajo de los 50°C, corresponde a la pérdida del agua superficial de la muestra, que representa el 1% de pérdida de masa aproximadamente. La segunda región, entre los 50°C a 200°C se relaciona con la pérdida del agua estructural [Vera, 2015], en esta región la pérdida de masa es del 19%. En estas dos regiones se tiene una pérdida de masa de menos del 20%. La tercera región que comprende desde los 200°C hasta los 700°C corresponde a la descomposición de las cadenas lineales de aminoácidos de la colágena, es por ello que en esta región se aprecia la mayor pérdida de masa, alrededor del 60%.



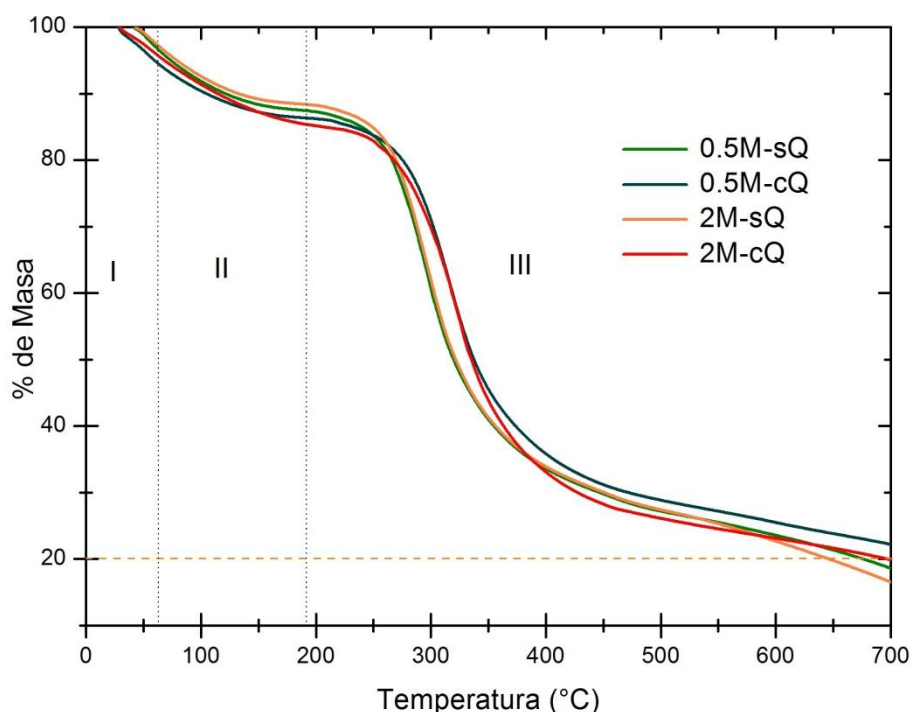
Gráfica 3.8. Comportamiento termogravimétrico a una rampa de calentamiento de 10min/°C de la muestra x0.5M-cQ. Se observan 3 regiones de pérdida de masa.

El comportamiento termogravimétrico de la muestra 0.5M-cQ, a una velocidad de calentamiento de 10min/°C con una atmósfera de N₂, fue muy parecido a la muestra 2M-cQ, en ambas se observan las tres regiones de pérdida de masa y el porcentaje de pérdida de masa promedio en ambas es comparable, por lo cual se puede decir que la concentración de ácido utilizado para la desmineralización no afecta en el comportamiento térmico de las muestras.

En la gráfica 3.9 y tabla 3.5, se observa el comportamiento termogravimétrico, es decir los procesos de pérdida de masa, y resultados obtenidos para las membranas bajo las distintas condiciones. A temperaturas menores a 50 °C se muestra un pico endotérmico, relacionado a la pérdida de agua reticular, es decir moléculas de agua que interactúan débilmente o que físicamente esta adsorbidas o unidas débilmente por puentes de hidrogeno (Barbosa & Cavalheiro, 2019). Las muestras tienen un comportamiento parecido aunque debido a la presencia del quitosano hay una pequeña diferencia en la segunda región, que corresponde a un proceso de descomposición térmica tanto de la colágena como del quitosano,

con picos exotérmicos alrededor de los 100 °C hasta los 200°C. La descomposición que ocurre cerca de los 300 °C de quitosano, muy probablemente se debe a la despolimerización de las cadenas y la descomposición de los anillos de piranosa, y cerca a los 500 °C el proceso de descomposición finaliza [Yáñez, 2019].

El estudio de la primera derivada, DTGA, permitió determinar que el proceso de degradación tuvo un máximo en 319.08 ± 1.61 °C para las membranas recubiertas con quitosano y 297.13 ± 0.51 °C las membranas sin recubrir.



Gráfica 3.9. Comportamiento termogravimétrico a una rampa de calentamiento de 10min/°C de las distintas muestras. Se observan 3 regiones de pérdida de masa con un comportamiento similar.

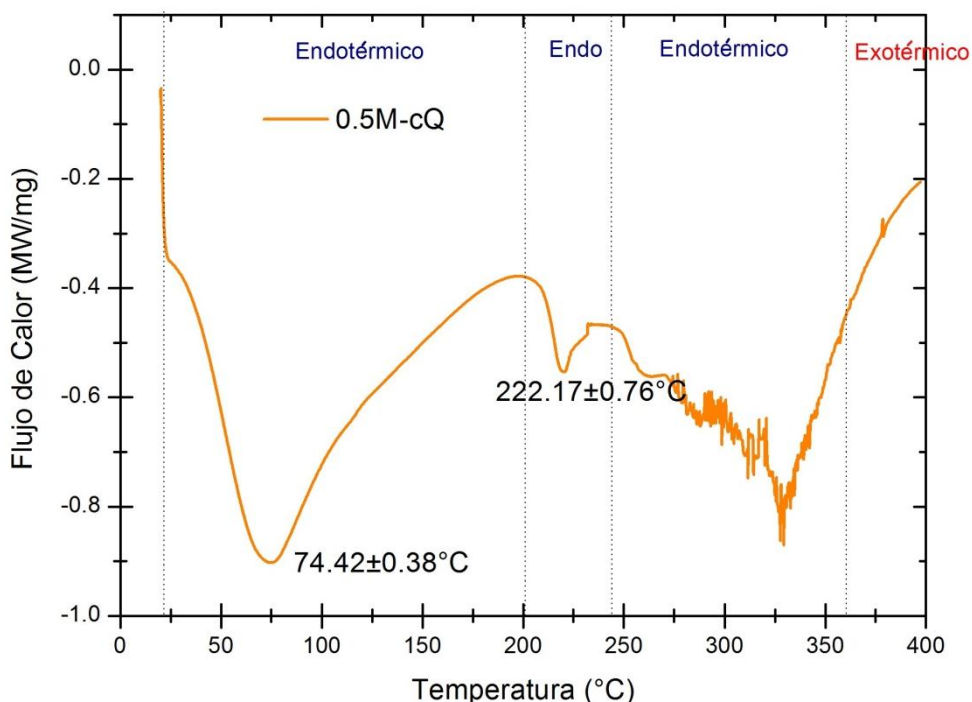
Tabla 3.5. Estas temperaturas se encontraron por medio de DTGA la primera derivada de la pérdida de masa (%) respecto de la temperatura.

Muestra	Región I		Región II		Región III	
	T (°C)	%Masa	T(°C)	%Masa	T (°C)	%Masa
0.5M-sQ	53.9 ± 0.42	1.65 ± 0.04	182.6 ± 0.21	16.9 ± 0.21	700	62.9 ± 0.11
2M-sQ	50.55 ± 2.37	1.6 ± 0.21	182.1 ± 0.35	8.32 ± 0.35	700	90.08 ± 4.7
0.5M-cQ	35.6 ± 2.38	0.99 ± 0.35	195.2 ± 3.31	18.64 ± 3.31	700	80.37 ± 1.18
2M-cQ	38.5 ± 0.71	1.57 ± 0.03	202.5 ± 5.3	19.22 ± 5.5	700	79.22 ± 0.62

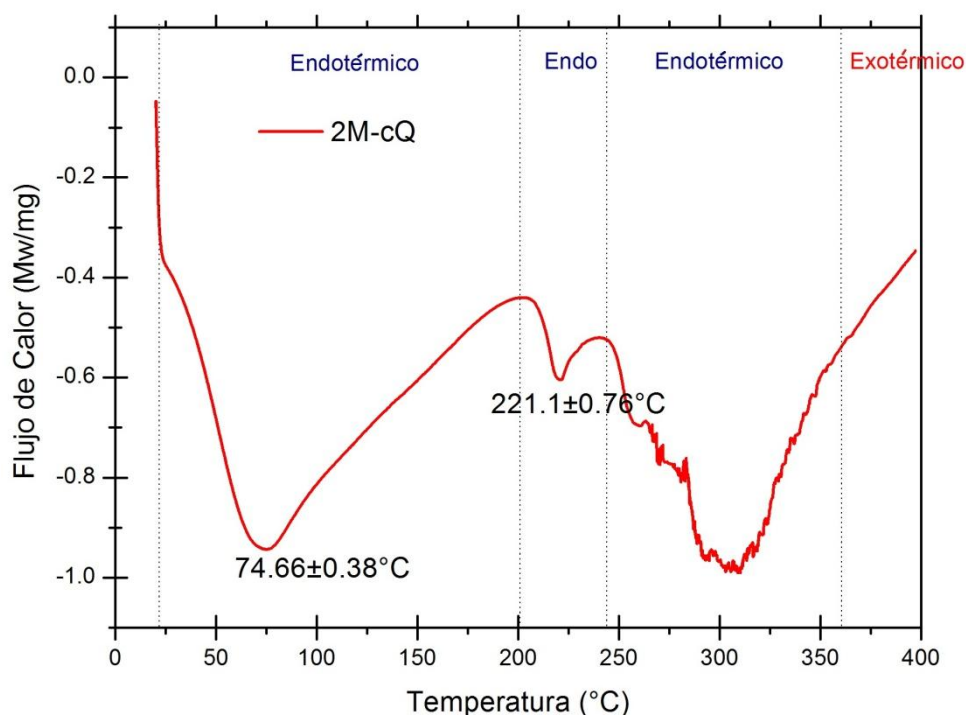
Calorimetría Diferencial de Barrido

Se realizó un análisis de calorimetría diferencial de barrido a la matriz ósea y a las membranas obtenidas, nuevamente se usaron muestras de 5-10 mg y el análisis se hizo desde los 20°C hasta 450°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min, con una atmosfera de N₂. El estudio se llevo a cabo en un Calorímetro diferencial de barrido Q200 (TA Instruments). El análisis de resultados se realizó con el programa Origin Pro 8 © y el programa TA Universal Analysis ©.

El estudio de DSC proporciona un método para examinar cambios en la colágena de tejido óseo y en particular, estudiar las condiciones bajo las cuales la estabilidad de la molécula se descompone, es decir, la desnaturalización de la proteína.



Gráfica 3.11. Comportamiento termogravimétrico a una rampa de calentamiento de 10min/°C de la muestra 0.5M-cQ. Se observan, 3 regiones de transiciones endotérmicas y se espera un pico exotérmico por arriba de los 400°C.



Gráfica 3.12. Comportamiento termogravimétrico a una rampa de calentamiento de 10min/°C de la muestra 0.2M-cQ. Se observan, 3 regiones de transiciones endotérmicas y se espera un pico exotérmico por arriba de los 400°C.

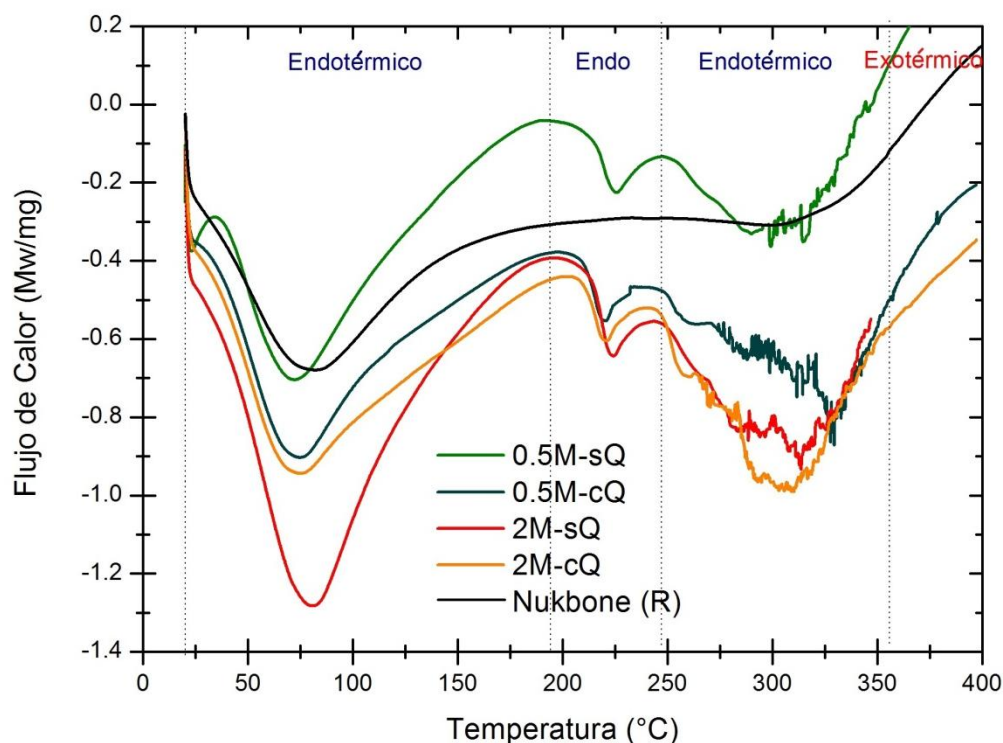
Se reconocieron tres regiones endotérmicas. La primera región se atribuye a la deshidratación y a la primera temperatura de desnaturalización (T_{dl}), es decir el desdoblamiento de la triple hélice de colágena en las membranas, ésta región se encuentra entre los 50° C y 200°C. La segunda región se extiende de 200°C a 250°C y está relacionada con el desdoblamiento de la hélice α levógira de la colágena, a la que se denominó segunda temperatura de desnaturalización (T_{dl}). La tercera región va desde los 250°C hasta los 350°C y puede deberse a la ruptura de las cadenas lineal de aminoácidos, es decir las cadenas α , en esta zona comienza la combustión de la colágena, lo que se ve como cavitaciones dentro del crisol del calorímetro, el estudio no pudo llevarse a una temperatura más alta para evitar algún daño en el equipo, pero por arriba de los 350°C se comienza a observar la tendencia de un pico exotérmico que corresponde a la descomposición de la colágena.

Del estudio de López et. al, se tiene que “la curva de DSC del quitosano evidenció un único evento endotérmico asociado a la fusión de las cadenas poliméricas. El inicio de esta transición térmica tuvo lugar a los 45 °C, mientras que el pico de fusión se detectó a los 73 °C. Por otra parte, la entalpía asociada a este evento térmico fue de 234 J/g. El termograma evidenció la presencia de un segundo pico que se atribuye a la fusión del quitosano de partida [López, 2018]”.

Del cálculo de las entalpías [J/g], por medio de medir el área bajo cada curva asociada a un pico endotérmico con el programa TA Universal Analysis ©, se tiene de una forma cuantitativa la estabilidad de cada membrana. Es sabido que entre mayor es el valor de la entalpía mayor es la estabilidad de la proteína, ya que se requiere de una mayor energía para producir un cambio de fase. En este estudio se encontró que para la primera temperatura de desnaturalización, las muestras obtenidas con 0.5M presentan una entalpía menor que las obtenidas con 2M. Esto puede deberse a que con una concentración de 0.5M más fibras de colágena se encuentran recubiertas de fase mineral por lo que hay menos desdoblamientos de triple hélice. Confirmando esta idea el recubrimiento, esto es porque las muestras 0.5M no presentan una diferencia significativa con y sin recubrimiento, caso contrario de las muestras 2M en la que la diferencia de entalpías con y sin recubrimiento es 140 J/g.

Por otra parte para la segunda temperatura de desnaturalización, presentan una menor dispersión en los valores de entalpía, ya que a estas temperaturas la cantidad de fase remanente en las membranas no contribuye a la estabilidad de la colágena.

La entalpía de la tercera zona no fue posible medirla ya que el estudio no pudo extender a una temperatura mayor de 400°C, pero se observa una tendencia parecida en las distintas membranas.



Gráfica 3.13. Comportamiento térmico a una rampa de calentamiento de 10min/°C de las muestras con distintas condiciones. Se observan 3 regiones de transiciones térmicas y un comportamiento similar en todas las muestras.

Tabla 3.6. Se observan 2 regiones de transiciones térmicas. No se aprecia una diferencia significativa en la temperatura de desnaturalización con las concentraciones molares que se trabajaron.

Muestra	Región I	Entalpía	Región II	Entalpía
	T_{dI} (°C)	(J/g)	T_{dII} (°C)	(J/g)
0.5M-sQ	71.9 ± 0.25	213.4 ± 9.34	225.4 ± 1.20	13.57 ± 0.33
2M-sQ	80.6 ± 0.31	374.9 ± 5.87	224.2 ± 0.35	13.29 ± 0.14
0.5M-cQ	69.88 ± 2.15	223.2 ± 23.09	221.52 ± 0.89	9.87 ± 0.29
2M-cQ	74.25 ± 0.25	234.63 ± 13.76	221.33 ± 0.50	10.72 ± 0.54
Nukbone®	94.82	195.4	-----	3.39

Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros de infrarrojo de las diferentes membranas se muestran en la gráfica 3.14. Para este estudio las muestras se cortaron de cubos de lado, sin tratamientos previos. El estudio se llevó a cabo en el Espectrómetro FTIR-ATR *Bruker Alpha Platinum*, a temperatura y presión ambiente, en un intervalo de longitud de onda de 4000-400 cm^{-1} . La región del espectro situada entre los 4000 a 1400 cm^{-1} , es de gran utilidad para la identificación de la mayoría de los grupos funcionales presentes en las moléculas orgánicas.

En la gráfica 3.14 se pueden observar las cinco bandas de absorción características de la colágena de acuerdo con la tabla 3.5. La banda de la amida I, la amida II, la amida III y la banda de la amida A, así como la banda correspondiente al grupo fosfato de la hidroxapatita [González, 2012]. Y en las membranas recubiertas con quitosano, las bandas presentan una mayor transmitancia al tener mayor cantidad de materia orgánica y se observa el grupo piranósico característico del quitosano [Hernández, 2009].

La banda de la amida I está relacionada con las vibraciones del grupo carbonilo del enlace peptídico C=O y por lo tanto está relacionada con la estructura de las proteínas, lo que la convierte en la banda infrarroja más útil para el análisis de la estructura secundaria de las proteínas. Cuando la banda cae alrededor de 1660 y 1650 cm^{-1} es asignada una forma helicoidal, en caso de presentar una banda en un rango de longitud de onda es inferior, 1630 cm^{-1} el estado de la espiral enrollada al azar [Kaminska, 1996].

En cuanto a la amida II, cuando la colágena presenta una estructura helicoidal la banda cae en 1550 cm^{-1} y para la estructura de espiral enrolla aleatoria se encuentra a 1530. En este caso la amida II, se ubicó a las 1540 cm^{-1} por lo que en las muestras puede que haya ambas estructuras, helicoidal y espiral enrollada al azar.

Las frecuencias de las bandas amida I y II dependen de la conformación de la colágena y cuando menor sea el orden estructural más baja es la frecuencia de

estas bandas amida [Rainer, 2001].

En el caso de las muestras, las obtenidas con una concentración molar de 0.5M, presentan una banda más cercana al valor reportado de la amida I que la muestra obtenida con una concentración molar de 2M, (Ver tabla 3.10). Lo cual indica que con una concentración molar menor se ve menos afectada la estructura secundaria de la colágena.

Tabla 3.7. Grupos funcionales identificados en el NUKBONE[®] por medio de la espectroscopia IR [Piña, 2006].

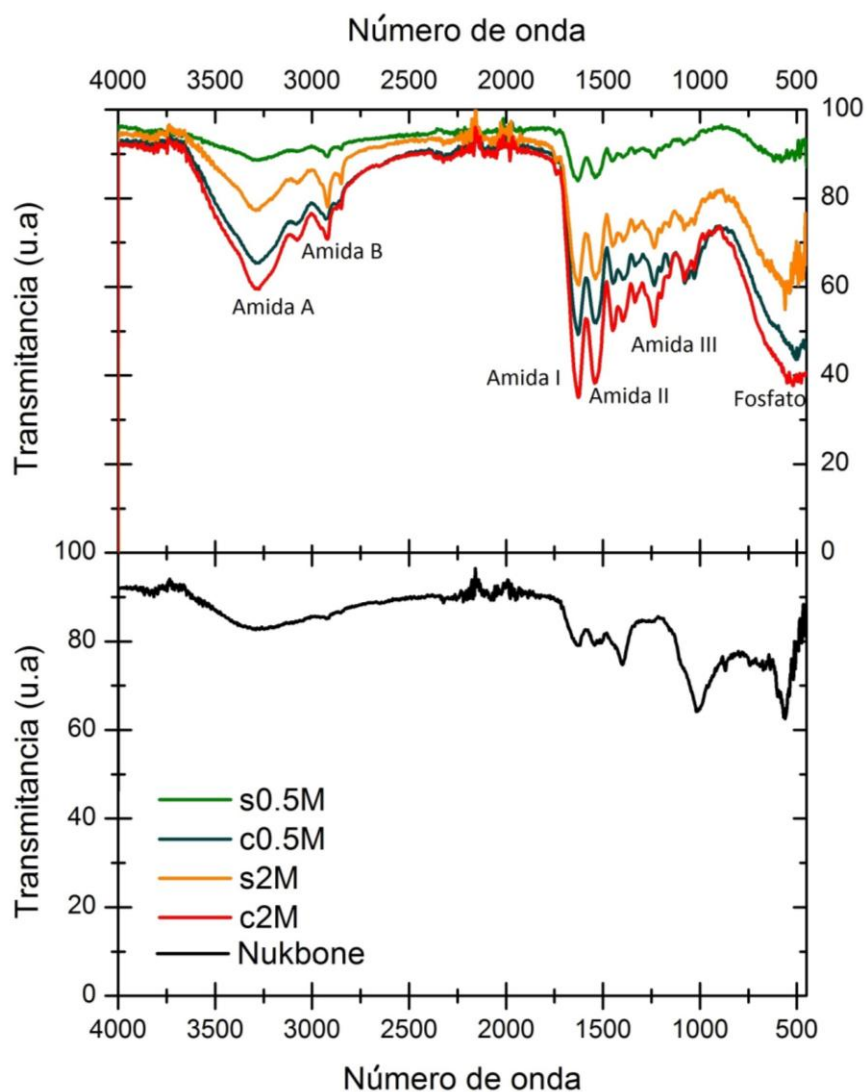
Compuesto	Banda (cm ⁻¹)
H ₂ O/ O-H	3 429
Proteína/ C-H	2 924
H ₂ O/ O-H	1 650
CO ₃ ²⁻ /C=O	1 546- 1 459
PO ₄ ³⁻ / P=O	1 413
CO ₃ ²⁻ /C-O	1 080
PO ₄ ²⁻ / P-O	1 033
CO ₃ ²⁻ /C=O	872
PO ₄ ²⁻ /O=P=O	603
CO ₃ ²⁻ /C=O	563

Tabla 3.8. Grupos funcionales identificados en la colágena por medio de la espectroscopia IR [León, 2013].

Grupo Funcional	IR (cm ⁻¹)
CH ₃	2956
CH ₂	2924
Amida I (C=O)	1630
Amida II (N-H), (C-N)	1530-1550
Amida III (N-H), (C-N)	1239
Amida A (N-H)	3325-3330
Amida B (CH ₂)	3080

Tabla 3.9. Grupos funcionales de amidas identificados en el quitosano por medio de la espectroscopia IR [Hernández, 2009].

Grupo Funcional	IR (cm ⁻¹)
O-H	3434
N-H	3254
C-H	2892
N-H	1621
Piranósico	1070
C-O-C	1014



Gráfica 3.14. Estudio de espectrometría de infrarrojo por transformadas de Fourier de las muestras desmineralizadas con una concentración 0.5M y 2M de HCl con y sin recubrimiento de quitosano, así como de Nukbone®.

Tabla 3.10. Grupos funcionales de amidas identificados en el quitosano por medio de la espectroscopia IR.

Muestra	Amida A (cm ⁻¹)	Amida B (cm ⁻¹)	Amida I (cm ⁻¹)	Amida II (cm ⁻¹)	Amida III (cm ⁻¹)	Piranósico (cm ⁻¹)	Fosfato (cm ⁻¹)
0.5M-cQ	3289.02 ± 4.18	3079.12 ± 0.52	1630.33 ± 1.98	1536.22 ± 1.99	1236.81 ± 1.99	1081.01 ± 1.99	1023.96 ± 2.19
2M-cQ	3288.45 ± 2.26	3079.12 ± 1.89	1625.46 ± 1.98	1538.66 ± 0.0	1234.38 ± 0.0	1078.58 ± 0.0	1026.64 ± 0.0
0.5M.sQ	3274.73 ± 6.27	3077.83 ± 2.27	1628.58 ± 2.98	1536.01 ± 2.99	1232.85 ± 1.99	---	1025.96 ± 3.28
2M-sQ	3275.64 ± 3.39	3075.90 ± 1.39	1625.84 ± 2.96	1539.57 ± 2.7	1234.18 ± 1.7	---	1021.31 ± 2.99
Nukbone®	3280.53 ± 0.27	3075.53 ± 0.27	1635.96 ± 1.52	1531.3 ± 5.32	1397.48 ± 2.71	--	1016.97 ± 3.85

Pruebas Mecánicas

Para estudiar la rigidez mecánica de las membranas de colágena tipo I se calculó el módulo de Young para las dos diferentes membranas en condiciones secas y húmedas. El módulo de Young (Y), o de elasticidad, es la relación entre la tensión ejercida sobre un área de la sección transversal del sistema y la deformación unitaria, entendida como la relación entre el cambio de longitud con respecto a la longitud inicial, en la dirección perpendicular a la sección transversal considerada. Físicamente, el módulo de Young representa la rigidez, o resistencia a la deformación, de un material a una carga impuesta y tiene las mismas unidades que el esfuerzo (unidades de presión). Gráficamente se interpreta como la pendiente de una recta en un diagrama tensión-deformación en la región donde el esfuerzo no exceda de un valor máximo denominado límite elástico [Popov, 1982]. Para una probeta larga sujeta por los extremos se alarga una cantidad ΔL bajo la acción de una fuerza y se calcula como:

$$Y = \frac{\text{Esfuerzo a la tensión uniaxial}}{\text{Deformación}} = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{\frac{F}{A}}{\frac{\Delta L}{L_0}}$$

donde Y es el módulo de Young, F la fuerza ejercida sobre el sistema, $\Delta L / L_0$ es la elongación axial sobre la longitud original de la muestra y A el área de la muestra perpendicular a la fuerza.

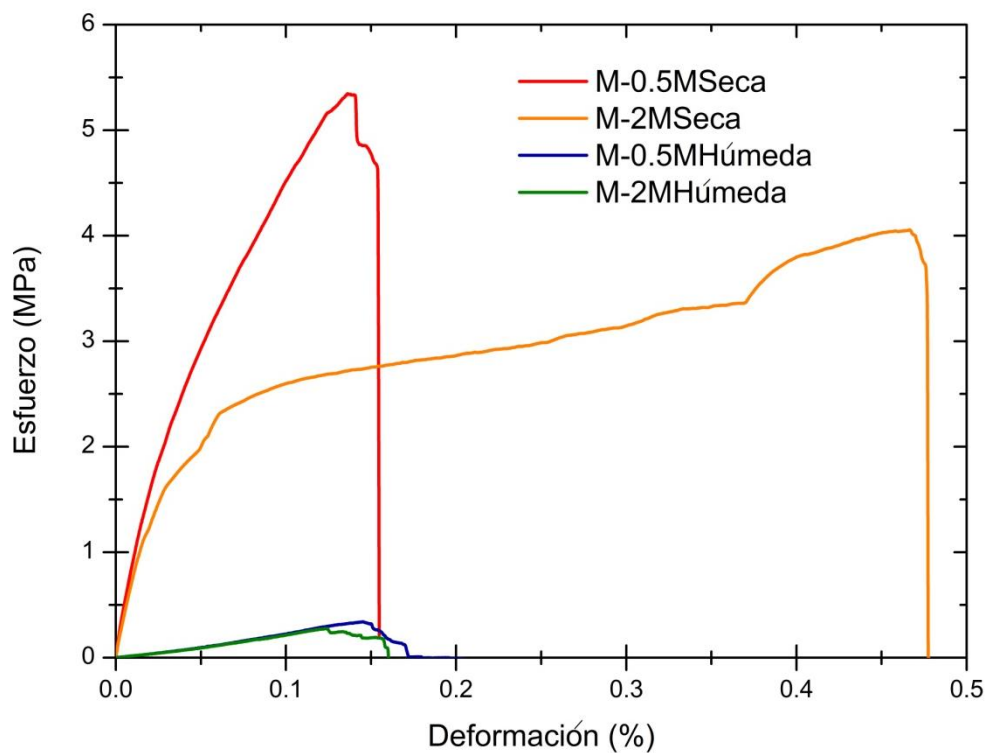
Las pruebas de tensión uniaxial se realizaron empleando una máquina de pruebas mecánicas Shimadzu con una celda de carga de 10kN, con probetas con dimensiones de 15 mm, 7 mm y 5 mm, a una velocidad de deformación de 9.6 mm/min a una temperatura de 25°C, por cada variable propuesta, concentración molar y con y sin recubrimiento se tomaron 5 probetas. Además los estudios se realizaron en condiciones secas, es decir no se hizo ningún tratamiento adicional a las muestras. Y en condiciones húmedas, en donde las membranas se sumergieron durante 24 horas en PBS.

A partir de los datos, fuerza y desplazamiento, adquiridos por el programa computacional TexturePro CT y las dimensiones de las probetas, se graficaron las

curvas de esfuerzo-deformación para determinar el módulo de Young.

Se estudió el comportamiento mecánico de las membranas en condiciones húmedas y secas, por supuesto húmedas son más flexibles, además lo ideal del manejo del área de la herida no es que se deseeque o que pierda humedad.

Las membranas en condiciones húmedas se hidrataron previamente, con PBS, a 37 °C durante 24 horas. De los resultados obtenidos se aprecia que el módulo de Young en condiciones secas y húmedas es bastante distinto, ver gráfica 3.15, para las membranas en seco se obtuvo un módulo de Young por arriba de los 70 MPa mientras que para las membranas en condiciones húmedas fue alrededor de 5MPa, lo que significa que su comportamiento elástico es dependiente de la cantidad de líquido que absorben [Anseth, 1996], [Jeon, 2007], [Hidalgo, 2019].



Gráfica 3.15. Comportamiento mecánico, antes un esfuerzo de tensión uniaxial, en condiciones secas y húmedas de las membranas de colágeno tipo I obtenidas de la desmineralización de hueso de bovino descelularizado con disoluciones de ácido clorhídrico al 0.5 y 2M.

Tabla 3.9. Comportamiento mecánico en condiciones secas y húmedas de las esponjas de colágena tipo I obtenidas de la desmineralización de hueso de bovino.

Molaridad	Secas	Húmedas
	Módulo de Young (MPa)	Módulo de Young (MPa)
0.5M-cQ	78.319 ±10.268	4.673 ± 0.340
2M-cQ	71.009 ± 1.199	2.415 ± 0.287

Se aprecia que las membranas obtenidas con solución de HCl 2M tienen un módulo de Young menor a las obtenidas con HCl 0.5 M, esto puede deberse a que con una concentración menor la estructura secundaria de la colágena se ve menos afectada. En comparación con los datos anteriores, las propiedades mecánicas para la hidroxiapatita son un módulo de Young de 40 a 117 GPa, para el hueso es de 21 GPa y para el cartílago es de 24 MPa.

La piel humana tiene un intervalo amplio de valores de módulo de Young, que depende de varios factores, como son: edad, raza del paciente, ubicación anatómica, condiciones ambientales y de la salud, y el método de medición [Jasen, 1958] [Xu, 2011]. De acuerdo a los estudios de Jasen encontraron valores del módulo de Young para piel humana de la región abdominal entre 2.9-54 MPa. Otros estudios [Ni, 2012] y [Kalra, 2016] encontraron valores entre 15 - 150 MPa y 14-100 MPa respectivamente.

Los valores encontrados en este trabajo se encuentran dentro de estos intervalos, por lo tanto, mecánicamente, las membranas de colágena tipo I obtenidas a partir de la desmineralización de hueso descelularizado son consistentes con las propiedades mecánicas de tejido cutáneo. En cuanto a la manipulación de las membranas, mecánicamente no resulta relevante, ya que estas membranas no necesitan costuras, solo se colocarían sobre la herida y posteriormente sujetas con vendaje convencional.

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

Las membranas de colágena obtenidas de la desmineralización de hueso de bovino descelularizado, tanto con 0.5M como con 2M durante 10 minutos, recubiertas con quitosano presentan propiedades físicas y químicas similares, y éstas propiedades las hacen buenas candidatas para aplicaciones en heridas en tejido cutáneo.

La microscopía electrónica de barrido no se observan daños en las trabéculas por efecto del HCl, es decir no se observa una pérdida en la arquitectura del Nukbone®. En las muestras recubiertas con quitosano, se apreció que en efecto el recubrimiento funciona como una capa que impediría el ingreso de agentes externos al organismo.

De los análisis térmicos fue posible estimar los valores de la temperatura de desnaturalización de cada una de las estructuras presentes en la colágena. Las entalpías indican que en las membranas obtenidas con 0.5M las fibras de colágena se encuentran recubiertas por una mayor cantidad de fase mineral.

Con la espectroscopia infrarroja se observaron la banda típica del quitosano y las cinco bandas características de la colágena, y por la posición de las bandas correspondientes a las Amidas I y II se encuentran presentes tanto la conformación hélice α y de ovillo aleatorio.

El análisis mecánico sugiere que los valores del módulo de Young son compatibles, tanto en condiciones húmedas y como secas, para los valores de elasticidad que presenta la piel. En futuros estudios, conviene estudiar el módulo de Young de las membranas sumergidas en PBS a distintos tiempos, ya que este valor se ve directamente relacionado con la capacidad de absorción de las membranas.

Los resultados obtenidos en este trabajo son satisfactorios en la parte física y química, pero se necesitan caracterizar de forma biológica con el fin de asegurar su uso en injertos en piel.

BIBLIOGRAFÍA

- [Agarwal, 2008] S. Agarwal, J. Wendorff, A. Greiner, *Polymer*, **49(26)**, 5603-5621, (2008).
- [Alvaro, 2010] T. Álvaro, R. Salvá, F. Fariñas-Guerrero, *Revista Española de Patología*, **43**, 24-32, (2010).
- [Andrades, 2000] P. Andrades, S. Sepúlveda y P. Wisnia, *Apuntes de Cirugía plástica*, Hospital Clínico, Universidad de Chile (2000).
- [Anún, 2018] J. Anún, F. Bagatello, M. Cid, R. Comín, *REVISTA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES*, **5(2)**, (2018).
- [Anseth, 1996] K. Anseth, C. Bowman y L. Brannon, *Biomaterials*, **17**, 1647-1657, (1996).
- [Askeland, 1998] D. Askeland, *Ciencia e ingeniería de los materiales*, International Thomson Editores, S.A de C.V, (1998).
- [Benjakul, 2010] S. Benjakul, Y. Thiansilakul, W. Visessanguan, S. Roytrayul, H. Kishimura, T. Prodpran, J. Meesane, *Food Chem.*, **89**, 132-138 (2010).
- [Bernales, 2004] D. Bernales, F. Caride, A. Lewis y L. Martin, *Rev Cubana Invest Biomed*, **23(2)**, 65-74, (2004).
- [Boyce, 2018] S. Boyce, A. Lalley, *Burns & Trauma*, **6(4)**, (2018).
- [Callister, 2016] W. Callister, D. Rethwisch, *Materials Science and Engineering*, Ed. Reverte, (2016).
- [Cen, 2008] L. Cen, W. Liu, L. Cui, W. Zhang, Y. Cao, *Collagen tissue engineering: Development of novel biomaterials*, **63**, 492-496 (2008).
- [Cesar, 2018] A.A. Cesar A., A. Olivos A., C. Landa C., Cardenas V, Silva P., Suarez C, Olivos B, Ibarra J., *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, **61 (6)**, (2018).
- [Chaves, 2014] M. Chaves, L. Calvo, R. Alvarado, O. Maderigal, A. Ulloa, C. Centeno, *Tecnología en Marcha. Edición especial Ingeniería de Tejidos*, 46-57 (2014).
- [Chern, 2009] P. Chern, C. Baum, & C. Arpey, *Dermatol. Surg*, **35(6)**, 891-906 (2009).

- [Croisier, 2013] F. Croisier, C. Jérôme, *European Polymer Journal*, **49**(4), 780-792, (2013).
- [Colorado, 2013] A. Colorado, C. Agudelo y M. Moncada, *Revista Ingeniería Biomédica*, **7**(14), 11-23, (2013).
- [Dantzer, 2015] E. Dantzer, *EMC. Cirugía plástica reparadora y estética*, **23**(1), (2015).
- [Dávalos, 2007] K. Dávalos, M. Aguilar, M. Piña, *Citotoxicidad Nukbone®*, UAM-UNAM (2007).
- [Del Prado, 2012] M. Del Prado, M. Piña, *Extracción y caracterización de colágena tipo I a partir de diferentes tejidos biológicos*, Tesis de maestría UNAM (2012).
- [Del Prado, 2016] M. Del Prado, M. Piña, *Elaboración de membranas de colágena tipo I entrecruzada con EDC como sustituto cutáneo*, Tesis de doctorado UNAM (2016).
- [Dimitriou, 2012] R. Dimitriou, G. Mataliotakis, G. Calori y P. Giannoudis, *BMC Medicine*, **10**(81), (2012).
- [Fergal, 2011] J. Fergal, *Materials Today*, **14**, 88-95, (2011).
- [Gacén, 1996] J. Joaquín, I. Gacén, *NUEVOS MATERIALES TEXTILES*, **110**, (1996).
- [García, 2001] C. García, *Biomateriales: Notas de clase Universidad de Medellín, Colombia*, (2001).
- [García, 2013] C. García C, *Cultivo de células en 3D: La nueva dimensión de los cultivos celulares*, 215-232, (2013).
- [Gartner, 2014] L. Gartner, J. Hiatt, *Color atlas and Text of Histology* (6a. ed), *Wolters Kluwer*, (2014).
- [Ghanaati, 2012] S. Ghanaati, *Acta Biomaterialia*, **8**, 3061-3072, (2012).
- [Giraldo, 2016] D. Giraldo, M. Piña, *Protocolo de descelularización cíclico de tráquea como método de obtención de un andamio natural 3D para ingeniería de órganos*, Tesis de doctorado UNAM, (2016).
- [Gong S, 2006] S. Gong, H. Wang, Q. Sun, S. Xue, J. Wang, *Biomaterials*, **27**, (2006).
- [Gómez, 2010] K. Gómez, M. Piña, *Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir*

de tendón bovino, Tesis de maestría UNAM, (2010).

[González, 2012] R. Gonzalez, M. Piña, *Síntesis y caracterización de nanocristales de hidroxiapatita obtenidos por el método de sol-gel*, Tesis de maestría UNAM (2012).

[Guarin, 2013] C. Guarín, P. Quiroga y N. Landínez, *Rev. Fac. Med.*, **61(4)**, 441-448, (2013).

[Hafemann, 1999] B. Hafemann, S. Ensslen, C. Erdmann, R. Niedballa, A. zühlke y K. Ghofrani, *Burns*, **25**, 373-384, (1999).

[Hernández, 2009] H. Hernández, E. Águila, O. Flores, E. Viveros y E. Ramos, *Superficies y Vacío*, **22(3)**, 57-60, (2009).

[Hernández, 2016] C. F. Hernández, R. Gómez., J. Prohias, L. Pascual, *Revista Cubana de Ingeniería*, **VII**, 15 – 25, (2016).

[Herranz, 2012] P. Herranz, X. Santos, Cicatrices, *Guía de valoración y tratamiento.*, Meda Pharma, España (2012).

[Hidalgo, 2018] J. Hidalgo, M. Piña, *Elaboración y caracterización de membranas de colágena-quitosán entrecruzadas con EDC para la regeneración ósea guida*, Tesis de maestría UNAM (2018).

[Jasen, 1958] L. Jasen y P. Rottier, *Dermatology*, 117, 65-83, (1958).

[Jiménez, 2004] P. Jiménez, *J. Surg.*, **184(5A)**, **56S64S** (2004).

[Jeon, 2007] O. Jeon, S. Song, K. Lee, M. Park, S. Lee y S. Hahn, *Carbohydrate Polymers*, **70**, 251-257, (2007).

[Kalra, 2016] A. Kalra, A. Lowe y A. Al-Jumaily, *Journal of Material Sciences & Engineering*, **5**, (2016).

[Kaminska, 1996] A. Kaminska, A. Sionkowska, *Polymer Degradation and Stability*, **51**, 19-26, (1996).

[Kharaziha, 2013] M. Kharaziha, M. Fathi y H. Edris, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, (2013).

[Lárez, 2003] C. Lárez, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **4(2)**, (2003).

- [Lehninger, 2005] D. Nelson, C. Cuchillo, A. Lehninger, & M. Cox, *Lehninger: Principios de Bioquímica* (4a. ed.). Barcelona: Omega. (2005).
- [León, 2013] B. León, M. Piña, *Caracterización físico-química de las membranas de colágena de origen óseo*, Tesis de Maestría UNAM (2013).
- [MacNeil, 2008] S. MacNeil, *MaterialsToday*, **11(5)**, (2008).
- [Martínez, 2012] L. Martínez, S. Guerrero, y M. Del Rio, *Actas Dermo-Sifiliográficas*, **103(1)**, 5-11 (2011).
- [Martínez, 2015] H. Martínez, M. Piña, *Descelularización de órganos: diseño y construcción de un dispositivo para la obtención de andamios 3D el inicio de los órganos bioartificiales en México*, Tesis de maestría UNAM, (2015).
- [Maurer, 2018] T. Maurer, M. Stoffel, Y. Belyaev, N. Stiefel, B. Vidondo, S. Küker, H. Schäfer y J. Balmer, *PLOS ONE*, (2018).
- [Merolli, 2009] a. Merolli, T. Joyce, *Biomaterials in Hand Surgery*, Springer, (2009).
- [Miguel, 2019] S. Miguel, C. Cabral, A. Moreira, I. Correia, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **181**, 994-1003, (2019).
- [Murphy, 2010] C. Murphy, *et al.*, *Biomaterials*, **31**, 461, (2010).
- [Murphy, 2014] S. Murphy, A. Atala, *Nature Biotechnology*, **1**, 1-4, (2014).
- [Nair, 2007] L. Nair, C. Laurencin, *Prog. Polym. Sci.*, **32**, 762–798, (2007).
- [Navarrete, 2003] G. Navarrete, *Rev Fac Med UNAM*, **46(4)**, (2003).
- [Ní, 2012] A. Ní, K. Bruyère, M. Destrade, M Gilchrist y M. Otténio, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **5**, 139-148, (2012).
- [Nyame, 2015] T. Nyame, H. Chiang, T. Leavitt, M. Ozambela, y D. Orgill, *Plast. Reconstr. Surg*, **136**, 1379-1388, (2015).
- [Nyman, 1987] S. Nyman, J. Gottlow, J. Lindhe, T. Karring, J. Wennstrom, *J. Periodontal Res.*, **22**, 252–254, (1987).
- [O'Brien, 2010] C. Murphy, and F. O'Brien, *Cell Adh Migr*, **4**, 377, (2010).

- [Pineda, 2015] S. Pineda, H. Rojas, *Rev. chil. dermatol* ; **31(2)**, 145-150, (2015).
- [Piña, 2006] M. Piña, N. Murguía, R. Palma y E. Lima, *Acta Ortopédica Mexicana*, **20(4)**, 150-155, (2006).
- [Piña, 2016] B. Mancilla, M. Araiza, J. Flores y M. Piña, *Journal of Applied Research and Technology*, **14**, 77-85, (2016).
- [Popov, 1982] E. Popov, T. Balan, *Mecánica de Sólidos*, (2a. ed.), Pearson Educación, (1982).
- [Rainer, 2001] E. Rainer, H. Hong, G. Hong-Wei, H. Xiang, C. Xun, H. Wei-Dong, *Vibrational Spectros*, (2001).
- [Ramshaw, 2009] J. Ramshaw, Y. Peng, V. Glattauer, J. Werkmeister, *Journals of Materials Science: Materials in Medicine*, **20** (2009).
- [Rana, 2015] D. Rana, H. Zreiqat, N. Benkirane-Jessel, S. Ramakrishna y M. Ramalingam, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, (2015).
- [Ravanetti, 2018] F. Ravanetti, A. Strange, N. Mardas, L. Bozec, A. Cacchioli, N. Kostomitsopoulos, N. Donos, *J. Periodontal Res.*, **53**, 430–439, (2018).
- [Rodríguez, 2009] A. T. Rodríguez A., Ramírez M., Rivero D., Bosquez E., Barrera-Necha L., Bautista-Baños, *Revista Chapingo Serie Horticultura*, **15(3)**, 307-317, (2009).
- [Rosanova, 2011] M. Rosanova, “*Infecciones en niños quemados: Análisis epidemiológico y factores de riesgo*”, Universidad de Buenos Aires, (2011).
- [Rulf, 2005] P. Rulf, Á. Morales, *Síntesis y caracterización de membranas de quitosano para aplicaciones en la regeneración de piel*, Universidad Estatal de Campinas, (2005).
- [Sachlos, 2003] E. Sachlos, & J. Czernuszka, *European Cells and Materials*, **5**, 29-40, (2003).
- [Salem, 2000] C. Salem, J. Pérez, E. Henning, F. Uherek, C. Schultz, J. Butte y P. González, *Cuad. Cir*, **14**, 90-99, (2000).
- [Salem, 2002] C. Salem, A. Vidal, P. Mariangel y M. Concha, *Cuad. Cir*, **16**, 77-86, (2002).
- [Sbricoli, 2019] L. Sbricoli, R. Guazzo, M. Annunziata, L. Gobbato, E. Bressan y L. Nastri,

Materials, **13**, 786- 802, (2019).

[Senet, 2007] P. Senet, *EMC - Dermatologie*, **2(2)**, (2007).

[Senet, 2008] P. Senet, *EMC, Dermatologie*, **98-040-A-10**, (2008).

[Shores, 2007] J. Shores, A. Gabriel & S. Gupta, *Adv. Skin Wound Care*, **20**,493-508 (2007).

[Soria, 2009] J. Soria, J. Barcia-González, J. Andrades, J. Romero, M. Monleón, J. García-Verdugo, *Trauma*, **20**, 15-22, (2009).

[Tinoco, 2020] F. Tinoco, “*Prevalencia y factores asociados a las complicaciones del injerto de piel en el Hospital José Arteaga. Cuenca, periodo 2016-2019*”, Universidad de Cuenca, (2020).

[Tonhi, 2002] E. Tonhi, A. Guzzi, *Quim. Nova*, **25(6)**, 943-948, (2002).

[Ungureanu, 2015] C. Ungureanu, D. Ionita, E. Berteanu, L. Tcacenco, A. Zuav, I. Demestrescu, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **26** (3), 458-465 (2015).

[Urciuolo, 2019] F. Urciuolo, C. Casale, G. Imperato G y A. Netti, *J. Clin. Med*, **8**, 2083-2109, (2019).

[Vera, 2015] S. Gómez, L. Villarreal, T. Ng, R. Vera, A. Iglesias y E. Serena, dx. Doi.org/10.24254/CNIB.15.39, (2015).

[Wan, 2005] Y. Wan , Z. Liu Z, X. Qu ,B. Han, J. Bei, *Biomaterials*, **26**, (2005).

[Xu, 2011] F. Xu, T. Lu, *Introduction to Skin Biothermomechanics and Thermal Pain*, (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp87-104., (2011).

[Zeas, 2016] I. Zeas, M. Ordóñez, “*Dermatología básica para el médico general*”, (2016).

[Zulay, 2011] Z. Mármol, G. Páez, M. Rincón, K. Araujo, C. Aiello, C. Chandler y E. Gutiérrez, *Revista Tecnocientífica URU*, **1**, (2011).

FE DE ERRATAS

1. En la portada dice “DESCELURIZADO” y debe decir “DESCELULARIZADO”.

Anexo A

Se midió el peso antes y después del proceso de desmineralización para calcular el porcentaje de fase inorgánica y orgánica presente en el Nukbone[®], este proceso se hizo para las dos concentraciones, 0.5M y 2M.

Se usó la ecuación:

$$\% \text{Hueso} = \%F_{\text{Orgánico}} + \%F_{\text{Inorgánico}} \Rightarrow \% \text{Hueso}_d = \%F_{\text{Orgánico}} + A \% F_{\text{Inorgánico}};$$

$$\Rightarrow \% F_{\text{Inorgánico}} = \frac{\% \text{Hueso} - \% \text{Hueso}_d}{1 - A}$$

donde A es la cantidad de fase inorgánica remanente después del proceso de desmineralización, ésta fase remanente se obtuvo de los termogramas de TGA.

Nukbone 0.5M											
Muestra1	Peso (g)	σ	Muestra2	Peso (g)	Σ	Muestra3	Peso (g)	σ	Muestra4	Peso (g)	σ
1	0.969	3.0625E-06	1	1.055	9E-06	1	0.685	5.0625E-06	1	0.839	5.0625E-06
2	0.967	6.25E-08	2	1.052	0	2	0.683	6.25E-08	2	0.837	6.25E-08
3	0.966	1.5625E-06	3	1.051	1E-06	3	0.682	5.625E-07	3	0.836	5.625E-07
4	0.967	6.25E-08	4	1.05	4E-06	4	0.681	3.0625E-06	4	0.835	3.0625E-06
0.96725		0.0005	1.052		0.0009	0.68275		0.0007	0.83675		0.0007

Muestra5	Peso (g)	σ	Muestra6	Peso (g)	Σ
1	1.143	6.25E-06	1	1.054	4E-06
2	1.141	2.5E-07	2	1.053	1E-06
3	1.14	2.5E-07	3	1.049	9E-06
4	1.138	6.25E-06	4	1.052	0
1.1405		0.0009	1.052		0.0009

Tabla A.1 2 Pesos de las muestras de Nukbone[®] antes de ser desmineralizadas con una concentración de 0.5M, cada peso se tomo 4 veces

Tabla A.2 Pesos de las muestras de Nukbone[®] antes de ser desmineralizadas con una concentración de 2M, cada peso se tomo 4 veces.

Nukbone		2M													
Muestra1	Peso (g)	σ	Muestra2	Peso (g)	σ	Muestra3	Peso (g)	σ	Muestra4	Peso (g)	σ				
1	0.923	6.25E-08	1	0.792	6.25E-08	1	0.689	6.25E-08	1	0.902	2.5E-07				
2	0.922	5.625E-07	2	0.791	5.625E-07	2	0.688	1.5625E-06	2	0.9	2.25E-06				
3	0.921	3.0625E-06	3	0.79	3.0625E-06	3	0.686	1.0562E-05	3	0.898	1.225E-05				
4	0.925	5.0625E-06	4	0.794	5.0625E-06	4	0.694	2.2563E-05	4	0.906	2.025E-05				
		0.92275	0.0007			0.79175	0.0007			0.68925	0.0015			0.9015	0.0015

Tabla A.3 Pesos de las muestras de Nukbone[®] después de ser desmineralizadas con una concentración de 0.5M, cada peso se tomo 4 veces.

Nukbone		0.5M													
desmineralizado															
Muestra1	Peso (g)	σ	Muestra2	Peso (g)	σ	Muestra3	Peso (g)	σ	Muestra4	Peso (g)	σ				
1	0.273	9E-06	1	0.295	5.0625E-06	1	0.188	5.625E-07	1	0.218	9E-06				
2	0.268	4E-06	2	0.29	7.5625E-06	2	0.185	5.0625E-06	2	0.219	4E-06				
3	0.27	0	3	0.293	6.25E-08	3	0.188	5.625E-07	3	0.224	9E-06				
4	0.269	0.000001	4	0.293	6.25E-08	4	0.188	5.625E-07	4	0.223	4E-06				
		0.27	0.0009			0.29275	0.0009			0.18725	0.0006			0.221	0.0013
Muestra5		Peso (g)	σ	Muestra6		Peso (g)	σ								
1		0.319	0.000001	1		0.286	5.625E-07								
2		0.322	4E-06	2		0.287	3.0625E-06								
3		0.323	9E-06	3		0.287	3.0625E-06								
4		0.316	0.000016	4		0.281	1.8062E-05								
		0.32	0.0014			0.28525	0.0012								

Tabla A.4 Pesos de las muestras de Nukbone® después de ser desmineralizadas con una concentración de 2M, cada peso se tomo 4 veces.

Nukbone desmineralizado			2M								
Muestra1	Peso (g)	σ	Muestra2	Peso (g)	σ	Muestra3	Peso (g)	σ	Muestra4	Peso (g)	σ
1	0.248	3.0625E-06	1	0.214	1.0563E-05	1	0.182	0.00000025	1	0.232	6.25E-08
2	0.247	5.625E-07	2	0.214	1.0563E-05	2	0.183	0.00000025	2	0.232	6.25E-08
3	0.246	6.25E-08	3	0.213	5.0625E-06	3	0.182	0.00000025	3	0.233	5.625E-07
4	0.244	5.0625E-06	4	0.202	7.6562E-05	4	0.183	0.00000025	4	0.232	6.25E-08
2	0.24625	0.0007		0.21075	0.0025		0.1825	0.0003		0.23225	0.0002

Tabla A.5 Fase inorgánicas y orgánica presente en el Nukbone® calculados a partir del proceso de desmineralización con 0.5M.

Fase Inorgánica	Fase Orgánica	Masa Total (F _I +F _O)	%F Inorgánico	σ_I	%F Orgánico	σ_O	%Total
0.597	0.37	0.967	61.737	0.001	38.263	0.001	100
0.659	0.393	1.052	62.643	0.767	37.357	0.767	100
0.396	0.287	0.683	57.980	14.344	42.020	14.344	100
0.516	0.321	0.837	61.649	0.014	38.351	0.014	100
0.721	0.42	1.141	63.190	2.026	36.810	2.026	100
0.667	0.385	1.052	63.403	2.677	36.597	2.677	100
			61.767	0.7422	38.233	0.7422	

Tabla A. 6 Fase inorgánicas y orgánica presente en el Nukbone® calculados a partir del proceso de desmineralización con 2M.

Fase Inorgánica	Fase Orgánica	Masa Total (F _I +F _O)	%F Inorgánico	σ_I	%F Orgánico	σ_O	%Total
0.577	0.346	0.923	62.514	1.374	37.486	1.374	100
0.481	0.311	0.792	60.732	0.371	39.268	0.371	100
0.406	0.283	0.689	58.926	5.833	41.074	5.833	100
0.57	0.332	0.902	63.193	3.429	36.807	3.429	100
			61.341	0.8294	38.659	0.8294	

Anexo B

En el presente anexo se muestran las graficas obtenidas de los triplicados de las muestras 0.5M-cQ y 2M-cQ, para las distintas pruebas realizadas.

Microscopio óptico

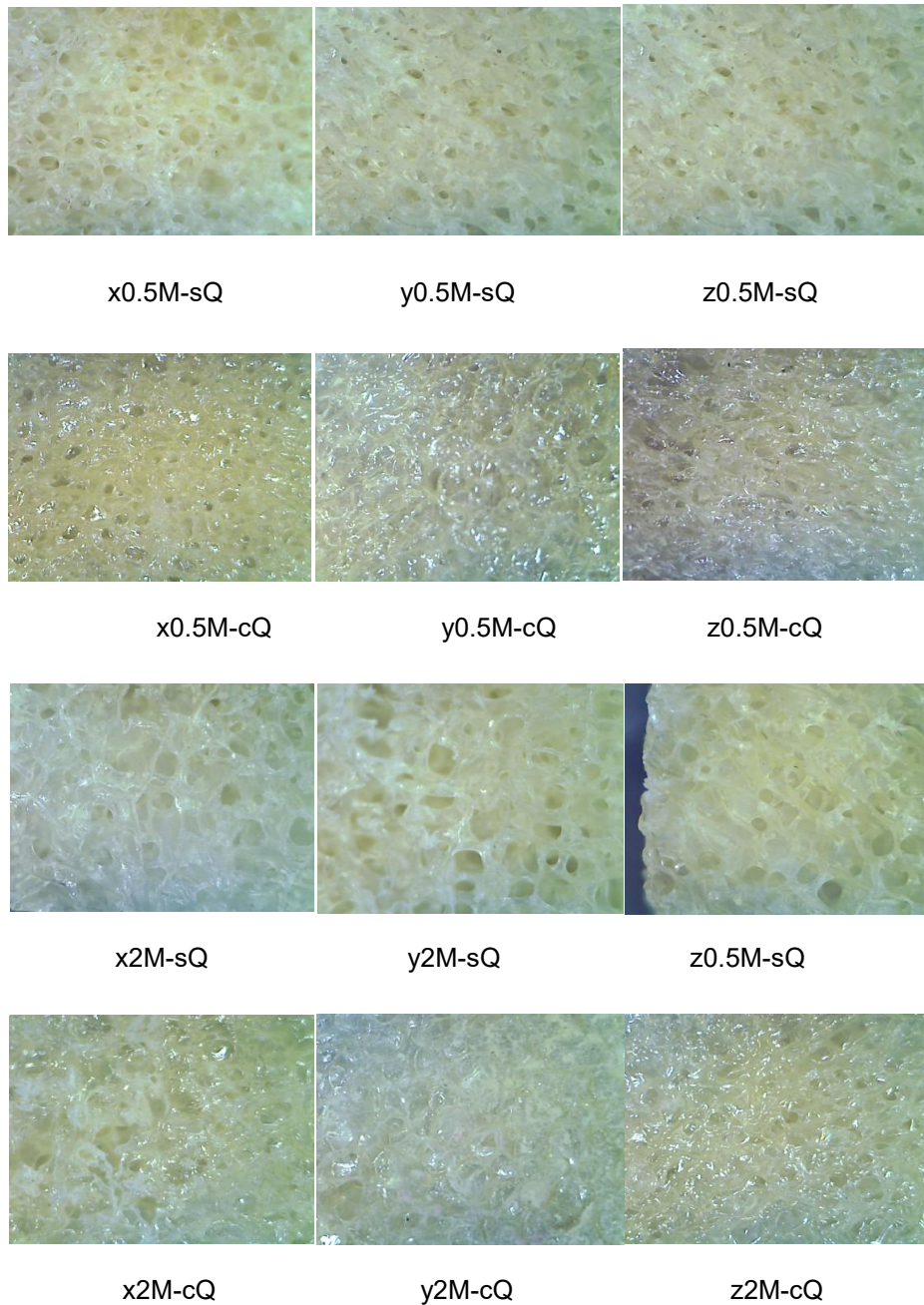


Figura B.1. Se aprecia que los poros no colapsaron y se mantuvo intacta la morfología de la matriz ósea, y una superficie similar en los triplicados.

SEM

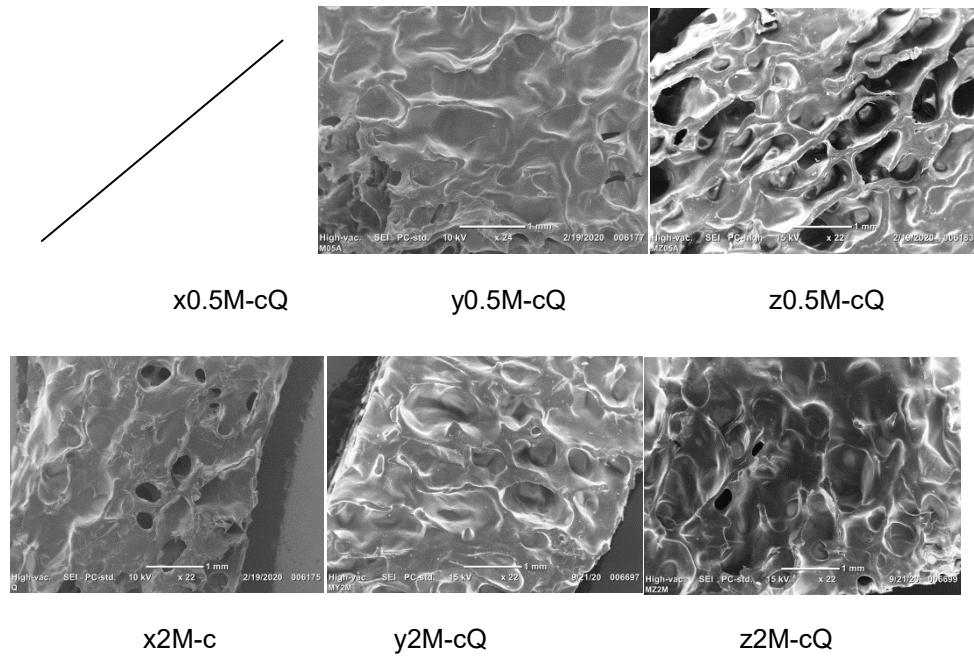


Figura B. 2. Membranas recubiertas con quitosano, se observa que todas las muestras tiene una superficie parecida.

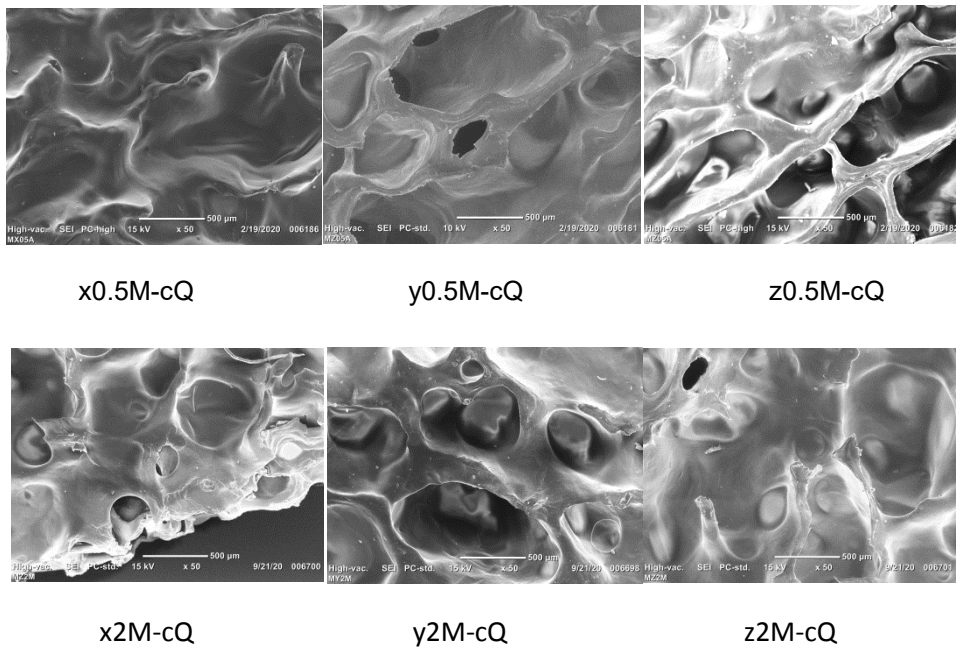


Figura B. 3 Micrografías 50 K de aumento en la que se observa la misma estructura de poros en las distintas muestras.

TGA

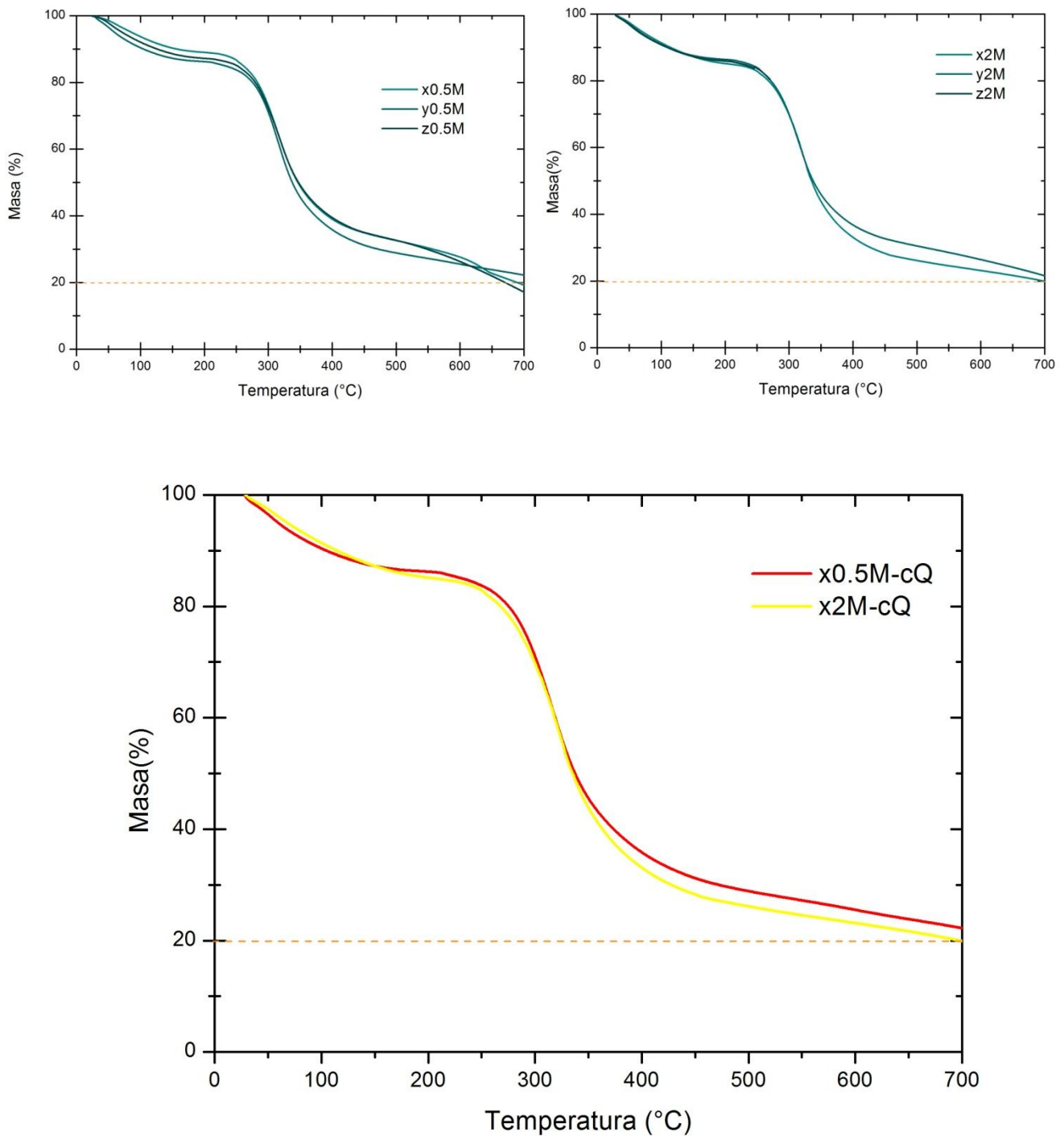


Figura B. 4. Comportamiento térmico de membranas, se logra apreciar una tendencia parecida en todas las muestras. Cabe recordar que todas las muestras son independientes entre sí.

DSC

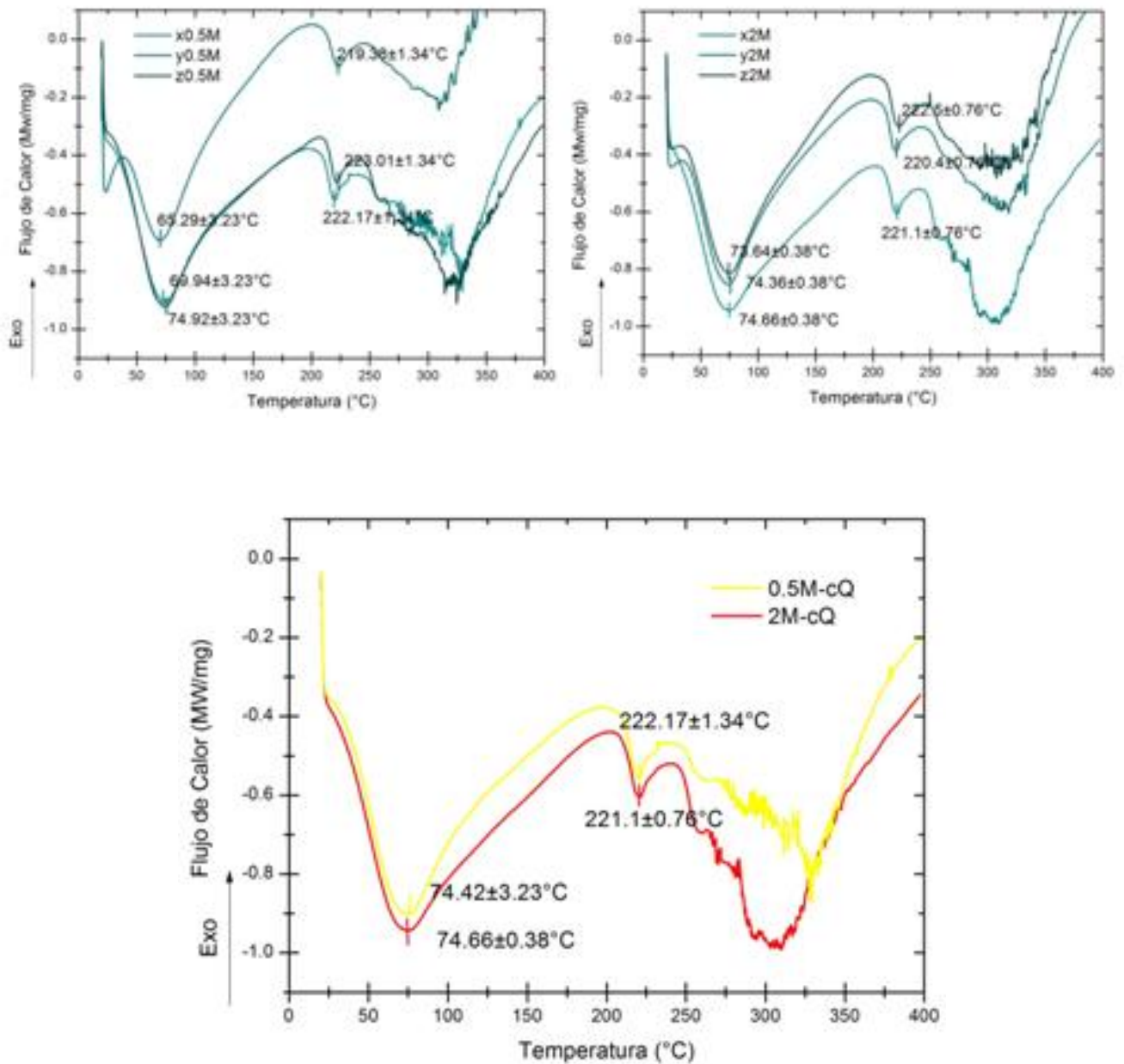


Figura B. 5. Temperaturas de desnaturalización, en todas las muestras se obtuvo un valor muy parecido, lo que indica que la estabilidad de la triple hélice y las cadenas lineales no fueron afectadas por el proceso de desmineralización.

FTIR

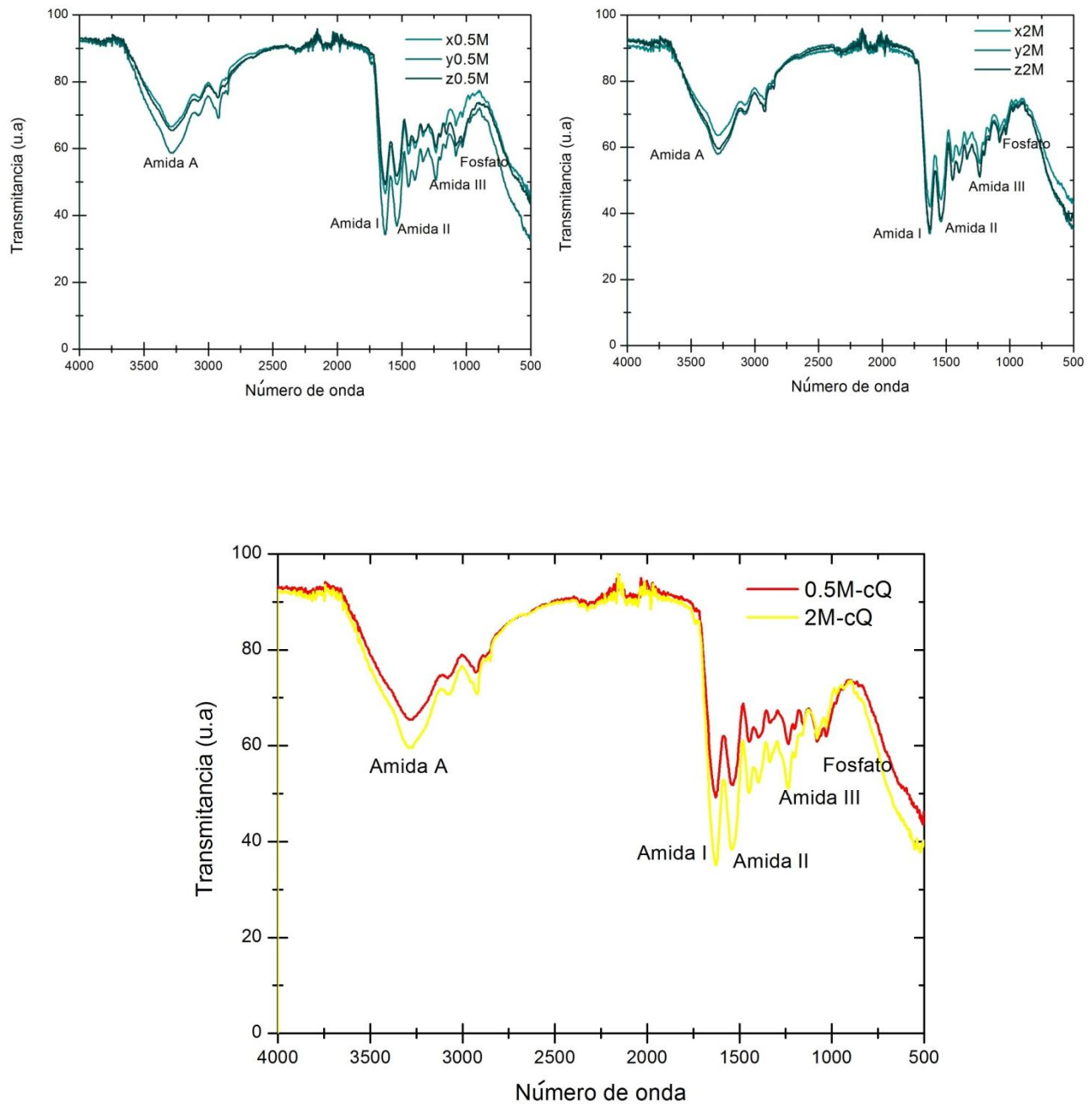


Figura B. 6. Del estudio de FTIR se observa que todas las muestras presentaron las bandas asociadas a la colágena y el quitosano en valores muy próximos a los reportados en la literatura. Con este estudio se demuestra que para ambas concentraciones la estabilidad de la estructura de la colágena es la misma.

Pruebas Mecánicas

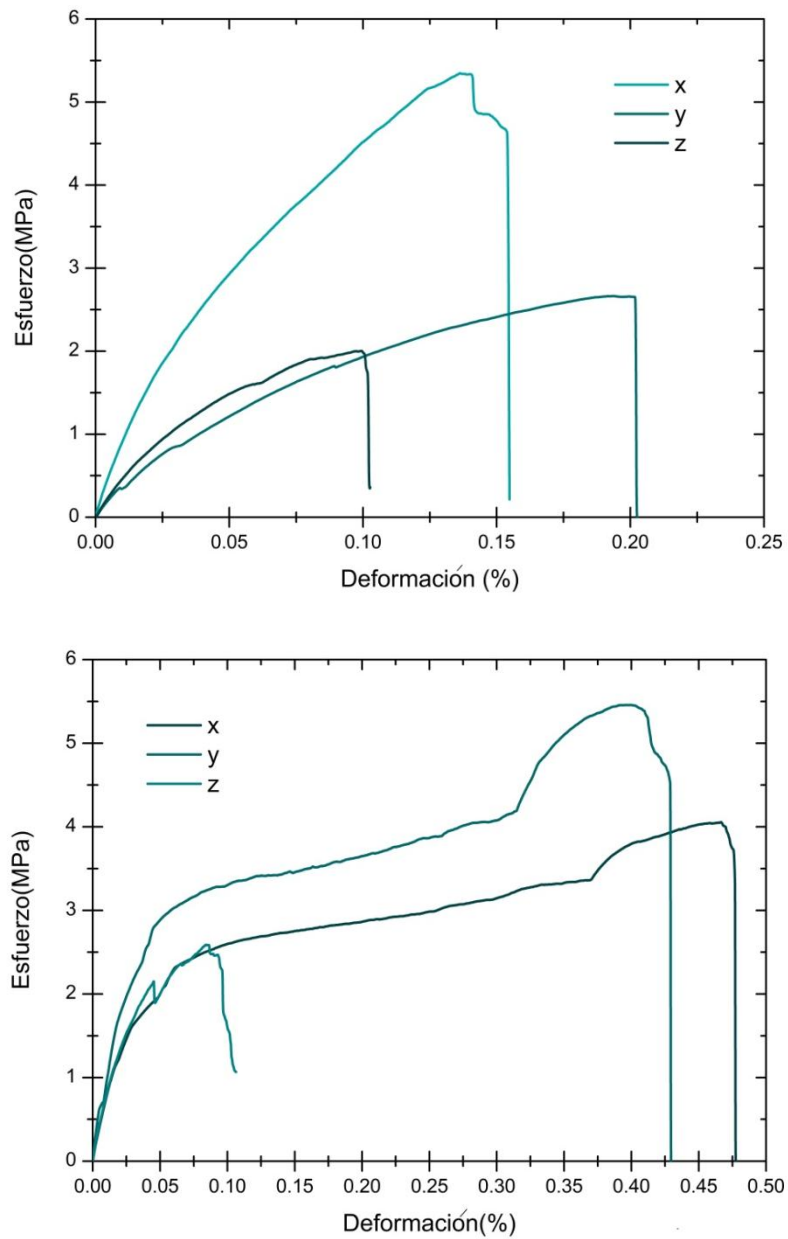


Figura B. 7. Comportamiento mecánico de las muestras en condiciones secas. Las diferencias que se notan en las curvas se deben al tipo de mordazas que fueron empleadas.

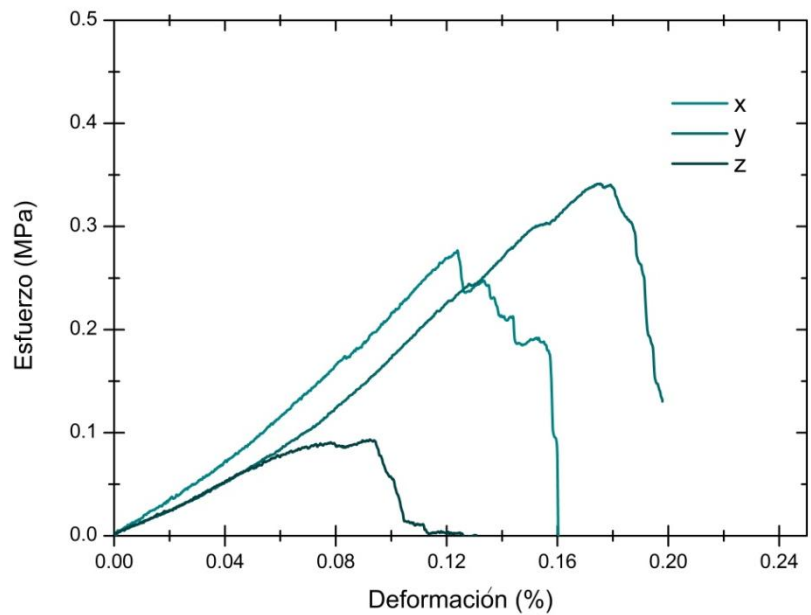
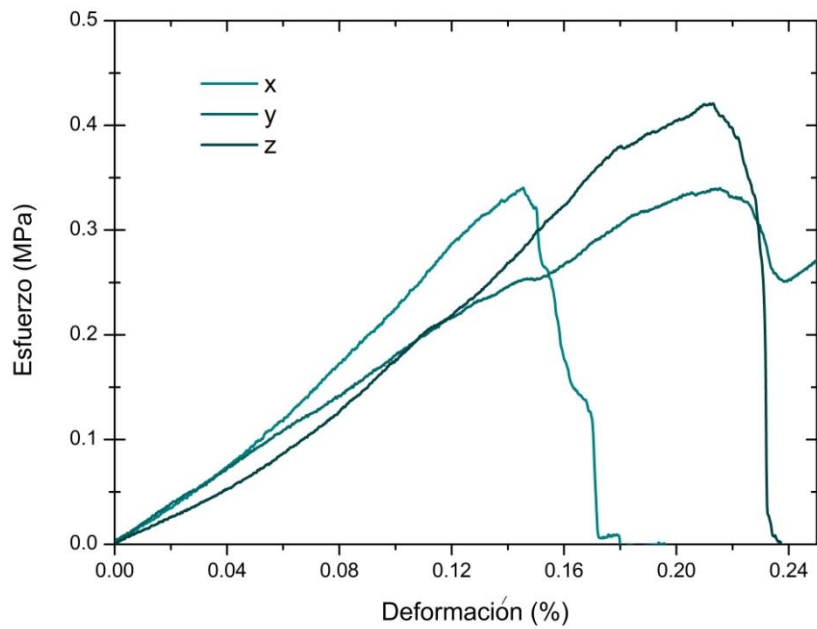


Figura B. 8. En éste caso, el módulo de Young en condiciones húmedas fue menor ya que la capacidad de absorción de las membranas de colágena esta relaciona con sus propiedades mecánicas. Ambos valores de módulo de Young entra en el rango de elasticidad que tiene la piel humana.