



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

**ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MEMBRANAS
DE COLÁGENA-QUITOSÁN ENTRECruzADAS CON EDC
PARA LA REGENERACIÓN ÓSEA GUIADA**

T E S I S

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

PRESENTA:
JOSÉ LUIS HIDALGO VICELIS

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. SUSANA PATRICIA MIRANDA CASTRO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN UNAM
DRA. NAYELI RODRÍGUEZ FUENTES
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A.C.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., MAYO 2018



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Filiberto Rivera Torres Facultad de Química UNAM
Primer Vocal	Dra. María Cristina Piña Barba Instituto de Investigaciones en Materiales UNAM
Segundo Vocal	Dr. Miguel Ángel Hernández Gallegos Facultad de Ingeniería UNAM
Tercer Vocal	Dr. José Ocotlán Flores Flores Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico UNAM
Secretario	Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez Facultad de Odontología UNAM

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ LA TESIS:

Laboratorio de Biomateriales
Departamento de Materiales Metálicos y Cerámicos
Instituto de Investigaciones en Materiales
Universidad Nacional Autónoma de México

Dedicatorias

*A mis padres, **Socorro y José Luis.***

*A mi hermano, **Mauricio.***

Agradecimientos

A la **Dra. María Cristina Piña Barba**, por su asesoría, por brindarme el apoyo y los recursos necesarios para realizar este proyecto, por su confianza, paciencia y amistad.

A los miembros del comité tutor, la **Dra. Susana Patricia Miranda Castro** y la **Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes**, por su asesoría, confianza y amistad.

A los miembros del jurado, el **Dr. Filiberto Rivera Torres**, el **Dr. Miguel Ángel Hernández Gallegos**, el **Dr. José Ocotlán Flores Flores** y el **Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez**, por sus aportaciones que enriquecieron esta tesis con su conocimiento y experiencia.

A la **Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes**, por su asesoría en la extracción, purificación y caracterización de la colágena tipo I en el Laboratorio de Biomateriales del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.

Al **Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández**, por su asesoría con el sistema de documentación de geles en el Laboratorio de Biología del Citoesqueleto de Parásitos de la Facultad de Medicina de la UNAM.

A la **Dra. Susana Patricia Miranda Castro**, por su asesoría en la extracción y caracterización del quitosán en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM.

Al **Dr. Juan Arturo Mendoza Nieto**, por su asesoría con el Espectrómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier por la técnica de Reflectancia Total Atenuada en el Laboratorio de Físicoquímica y Reactividad de Superficies del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.

A la **Ing. Karla Eriseth Reyes Morales**, por su asesoría con el equipo Termogravimétrico y el Calorímetro Diferencial de Barrido en el Laboratorio de Análisis Térmico del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.

Al **Dr. Alfredo Maciel Cerda**, por su disposición para realizar los cortes de las membranas para el ensayo de tensión uniaxial en el Laboratorio de Nanofibras para Ingeniería de Tejidos del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.

Al **Biól. Armando Zepeda Rodríguez** y **Francisco Pasos Nájera**, por la preparación de las membranas para su observación en el Microscopio Electrónico de Barrido en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Al **Ing. Carlos Flores Morales**, por su asesoría con el Microscopio Electrónico de Barrido en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.

Al **Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez**, por su ayuda con los ensayos biológicos *in vitro* en el Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría.

Al **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica** (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, a través del proyecto “Membranas biocompatibles, separadoras y regeneradoras de tejidos biológicos” con clave IT100117, por el apoyo financiero y la beca otorgada para la obtención del grado.

Al **Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado** (PAEP) de la Coordinación de Estudios de Posgrado de la UNAM por el apoyo financiero para la participación en congresos nacionales e internacionales.

A la **coordinación** y al **personal administrativo** del Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales, por su apoyo y compromiso.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** a través del **Instituto de Investigaciones en Materiales** y al **Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales**, por formarme como profesionista y como persona.

A mis **profesores**, por compartir su conocimiento y experiencia; y por su amistad.

A mis amigos del instituto: **Roberto, Héctor, Karla, David, Juan Manuel, Gaby y Ale**; por hacer tan interesante y divertido aprender.

A mis padres, **Socorro y José Luis**, por su apoyo incondicional en todo momento.

A mi hermano **Mauricio**, por ser mi compañía en esta etapa de universitarios.

A mi tía **Lulú** y a mi primo **Miguel**; por su apoyo al estar lejos de casa.

Y a todas aquellas personas que han influido de alguna forma en mí para ser una mejor persona.

Resumen

En el área de implantología dental, un problema bastante frecuente es la escasa disponibilidad ósea. Al perderse un diente, se produce una reabsorción del hueso alveolar que, en algunos casos, dificulta o hace completamente imposible la colocación de implantes. Con el fin de resolver estas dificultades, se ha desarrollado la técnica de aumento óseo conocida como “regeneración ósea guiada”. En este procedimiento, se coloca injerto óseo (hueso descelularizado) en la cavidad dejada por la extracción de una pieza dental y se inserta quirúrgicamente una membrana (material de barrera) sobre el defecto óseo de relleno para impedir la invasión de la cavidad por células de tejidos conectivos no osteogénicos y, de esta manera, favorecer la formación de tejido óseo.

Las membranas pueden ser desarrolladas usando diversos polímeros de origen natural o sintético. Actualmente, los polímeros naturales, como la colágena y el quitosán, han sido ampliamente utilizados en la ingeniería de tejidos debido a que promueven la adhesión, el crecimiento y la diferenciación celular. Sin embargo, el uso de estos biomateriales está limitado por su baja estabilidad térmica y alta susceptibilidad enzimática. Una alternativa para mejorar estas propiedades fisicoquímicas es mediante el entrecruzamiento químico usando una variedad de agentes. El N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) es un agente que se ha convertido en un reactivo de entrecruzamiento atractivo para las proteínas o sustancias químicas que tengan grupos carboxilo o amino debido a que no forma parte del producto final.

El objetivo de este estudio fue desarrollar membranas de colágena-quitosán mejorando sus propiedades fisicoquímicas mediante el entrecruzamiento químico con EDC para ser utilizadas en la regeneración ósea guiada. Las membranas se prepararon a diferentes proporciones de colágena tipo I y quitosán por la técnica de evaporación del disolvente, se entrecruzaron con EDC y se caracterizaron en términos de estructura química, absorción de PBS, comportamiento térmico y mecánico, degradación *in vitro* y, morfología. Asimismo, el comportamiento biológico se estudió analizando la interacción de osteoblastos fetales humanos con las membranas mediante ensayos de adhesión, viabilidad y morfología celular.

Las membranas entrecruzadas mostraron una mayor estabilidad térmica y mecánica, así como una menor degradación enzimática que las membranas sin entrecruzar. Además, los ensayos biológicos sugirieron que las membranas entrecruzadas no son citotóxicas.

Por lo tanto, el entrecruzamiento mejora las propiedades fisicoquímicas de las membranas sin afectar la biocompatibilidad de éstas, lo que indica que las membranas de colágena-quitosán entrecruzadas con EDC representan una opción muy prometedora para su aplicación en la regeneración ósea guiada.

Abstract

In the area of dental implantology, a very common problem is the low bone availability. When a tooth is lost, a reabsorption of the alveolar bone occurs that, in some cases, makes it difficult or impossible to place implants. In order to solve these difficulties, the bone augmentation technique known as "guided bone regeneration" has been developed. In this procedure, bone graft (decellularized bone) is placed in the cavity left by the extraction of a dental piece and a membrane (barrier material) is surgically inserted over the bone defect to prevent invasion of the cavity by cells of non-osteogenic connective tissues and, in this way, promote the formation of bone tissue.

The membranes can be developed using various polymers of natural or synthetic origin. Currently, natural polymers, such as collagen and chitosan, have been widely used in tissue engineering because they promote adhesion, growth and cell differentiation. However, the use of these biomaterials is limited by their low thermal stability and high enzymatic susceptibility. An alternative to improve these physicochemical properties is by chemical crosslinking using a variety of agents. The N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC) is an agent that has become an attractive crosslinking reagent for proteins or chemical substances that have carboxyl or amino groups because it is not part of the final product.

The objective of this study was to develop collagen-chitosan membranes improving their physicochemical properties by chemical crosslinking with EDC to be used in guided bone regeneration. The membranes were prepared at different ratios of collagen type I and chitosan by the solvent evaporation technique, crosslinked with EDC and characterized in terms of chemical structure, PBS absorption, thermal and mechanical behavior, *in vitro* degradation and morphology. Likewise, the biological behavior was studied analyzing the interaction of human fetal osteoblasts with the membranes by adhesion, viability and cell morphology tests.

The crosslinked membranes showed high thermal and mechanical stability, as well as low enzymatic degradation than the uncrosslinked membranes. In addition, the biological tests suggested that the crosslinked membranes are not cytotoxic. Therefore, crosslinking improves the physicochemical properties of the membranes without affecting their biocompatibility, which indicates that collagen-chitosan membranes crosslinked with EDC represent a very promising option for their application in guided bone regeneration.

Índice General

Índice de Figuras	iii
Índice de Tablas	vii
Glosario de Siglas y Abreviaturas	viii
Glosario de Unidades y Símbolos	viii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1. Regeneración Ósea Guiada	3
2.2. Membranas de Barrera.....	4
2.2.1. Membranas Reabsorbibles	5
2.2.2. Membranas No Reabsorbibles.....	6
2.3. Polímeros Sintéticos y Naturales	8
2.4. Colágena.....	9
2.5. Quitosán.....	11
2.6. Entrecruzamiento	12
2.7. Membranas de Colágena Tipo I y Quitosán.....	14
3. Objetivos	16
3.1. Objetivo General.....	16
3.2. Objetivos Específicos	16
4. Metodología	17
4.1. Materiales y Equipos.....	17
4.1.1. Reactivos.....	17
4.1.2. Equipos.....	18
4.2. Extracción, Purificación y Caracterización de la Colágena Tipo I	20
4.2.1. Extracción.....	20
4.2.2. Purificación	21
4.2.3. Cuantificación.....	22
4.2.4. Electroforesis.....	24
4.3. Extracción y Caracterización del Quitosán	25
4.3.1. Extracción.....	25
4.3.2. Grado de Desacetilación	26
4.3.3. Peso Molecular Promedio	27
4.4. Elaboración de Membranas de Colágena-Quitosán.....	29
4.5. Caracterización Físicoquímica de las Membranas de Colágena-Quitosán	29
4.5.1. Espectroscopía de Infrarrojo	29
4.5.2. Absorción de PBS	30
4.5.3. Análisis Térmico	30
4.5.4. Ensayo Mecánico	31
4.5.5. Degradación <i>in vitro</i>	33
4.5.6. Morfología.....	33

4.6. Caracterización Biológica de las Membranas de Colágena-Quitósán	33
4.6.1. Cultivo Celular	33
4.6.2. Adhesión Celular	34
4.6.3. Viabilidad Celular	34
4.6.4. Morfología Celular	35
4.7. Análisis Estadístico.....	36
5. Resultados y Discusión	37
5.1. Caracterización de la Colágena Tipo I	37
5.1.1. Cuantificación	37
5.1.2. Electroforesis.....	38
5.2. Caracterización del Quitósán	39
5.2.1. Grado de Desacetilación	40
5.2.2. Peso Molecular Promedio	41
5.3. Membranas de Colágena-Quitósán.....	42
5.4. Caracterización Físicoquímica de las Membranas de Colágena-Quitósán	44
5.4.1. Espectroscopía de Infrarrojo	44
5.4.2. Absorción de PBS	46
5.4.3. Análisis Térmico	48
5.4.4. Ensayo Mecánico	52
5.4.5. Degradación <i>in vitro</i>	55
5.4.6. Morfología.....	59
5.5. Caracterización Biológica de las Membranas de Colágena-Quitósán.....	66
5.5.1. Adhesión Celular	66
5.5.2. Viabilidad Celular	67
5.5.3. Morfología Celular	69
6. Conclusiones.....	72
7. Referencias	73
8. Apéndice	80
8.1. Preparación de Disoluciones	80
8.2. Análisis Térmico.....	81
8.3. Técnicas Analíticas	83
8.3.1. Espectrometría UV-visible (UV-vis).....	83
8.3.2. Espectroscopía de Infrarrojo (IR)	84
8.3.3. Análisis Termogravimétrico (TGA)	86
8.3.4. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	89
8.3.5. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	91

Índice de Figuras

Figura 1. Procedimiento que se lleva a cabo en la técnica de regeneración ósea guiada: a) se extrae el diente y la cavidad dejada por el diente se limpia del tejido infectado e inflamado, b) se coloca injerto óseo en la cavidad, c) se coloca una membrana sobre el injerto para mejorar el crecimiento óseo, y d) se suturan las encías para permitir la curación de los tejidos blandos.	3
Figura 2. Membrana de colágena (Neomem® FlexPlus).....	6
Figura 3. Membrana de politetrafluoroetileno expandido (Cytoflex® TEF-Guard).	7
Figura 4. Malla de titanio (Salvin®).	8
Figura 5. a) Cadena alfa y b) triple hélice de la colágena (Lodish et al., 2007).....	10
Figura 6. Estructura química de a) la quitina y b) el quitosán. La principal fuente de producción de quitosán es la hidrólisis de la quitina en medio alcalino a altas temperaturas (Olteanu y Enescu, 2007).	11
Figura 7. Representación esquemática de las redes poliméricas entrecruzadas a) físicamente y b) químicamente (Figura modificada de Li, 2004).	12
Figura 8. Esquema de la reacción de entrecruzamiento con EDC. Las moléculas R ₁ y R ₂ pueden ser péptidos, proteínas o cualquier sustancia química que tenga grupos carboxilo y amina primaria (Figura modificada de Thermo Scientific, 2017).....	14
Figura 9. Cuadro metodológico del proceso de extracción de la colágena tipo I.	21
Figura 10. Cuadro metodológico del proceso de purificación de la colágena tipo I.	22
Figura 11. a) Estructura de la hidroxiprolina y b) compuesto quinoide (Ignat'eva et al., 2007).	22
Figura 12. Montaje de las muestras en la microplaca para su medición en el lector de placas.	23
Figura 13. Equipo de electroforesis empleado para conocer la pureza de la colágena tipo I. Fuente de corriente continua (izquierda) y cámara de electroforesis (derecha).	25
Figura 14. Cuadro metodológico del proceso de extracción de la quitina a partir de exoesqueletos de camarón y su conversión a quitosán.	25
Figura 15. Montaje de la titulación potenciométrica para determinar el grado de desacetilación del quitosán.	27
Figura 16. Montaje de la viscosimetría capilar para determinar el peso molecular promedio del quitosán.	28

Figura 17. A) Corte de las membranas empleando un suaje y una prensa hidráulica, b) dimensiones de las probetas (en milímetros) de acuerdo con la norma ASTM-D1708-96 y c) probeta (membrana C100) hidratada con PBS.	32
Figura 18. Texturómetro empleado para los ensayos de tensión uniaxial y algunos de sus componentes para el montaje de la probeta (membrana C100) hidratada con PBS.	32
Figura 19. Mecanismo de detección de la viabilidad celular con CCK-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., 2017).....	35
Figura 20. Recta de calibración de hidroxiprolina. La cuantificación de hidroxiprolina permite estimar la concentración de la colágena tipo I. Las desviaciones estándares son directamente proporcionales a las incertidumbres de las constantes de la recta.	37
Figura 21. Disolución de la colágena tipo I obtenida a partir del tendón de bovino.	38
Figura 22. Patrón electroforético de la colágena tipo I (Col I) en las diferentes etapas del proceso de extracción y purificación. Carril 1 y 4: marcador de pesos moleculares; carril 2: Col I antes de la digestión enzimática; carril 3: Col I después de la digestión enzimática; carril 5: Col I después del proceso de purificación; y carril 6: estándar de Col I.	39
Figura 23. a) Exoesqueletos de camarón, b) quitina y c) quitosán.	40
Figura 24. Disolución de quitosán obtenida a partir de los exoesqueletos de camarón....	40
Figura 25. a) Curva potenciométrica (línea continua) y b) primera derivada de la curva potenciométrica (línea punteada) de la disolución de quitosán.	41
Figura 26. Viscosidad reducida frente a la concentración de la disolución de quitosán. Las desviaciones estándares son directamente proporcionales a las incertidumbres absolutas de las constantes de la recta.	42
Figura 27. Membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento; y una membrana comercial (Membracel [®] -O) como control.	43
Figura 28. Espectros de infrarrojo de las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros a) sin y b) con entrecruzamiento; y de la membrana comercial.....	45
Figura 29. Porcentaje de absorción de PBS por las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento; y por la membrana comercial (ns indica que no existe diferencia significancia entre el control y las diferentes membranas elaboradas y; **** denota que existe diferencia significativa entre las distintas membranas sin entrecruzar y entrecruzadas).....	47
Figura 30. Termogramas de TGA y DSC de las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros a) sin y b) con entrecruzamiento; y de la membrana comercial. En el análisis de DSC, la masa inicial de las diferentes muestras fue la misma debido a que el flujo de calor es una propiedad extensiva.	49
Figura 31. Termogramas de TGA y DSC de la membrana C75 a) sin y b) con entrecruzamiento.....	51

Figura 32. Curvas de esfuerzo-deformación de las membranas de colágena-quitósán y de sus componentes puros a) sin y b) con entrecruzamiento; y de la membrana comercial.	53
Figura 33. Esfuerzo último a la tensión de las membranas de colágena-quitósán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento; y de la membrana comercial (ns indica que no existe diferencia significancia entre el control y las diferentes membranas elaboradas y; ** y *** denota que existe diferencia significativa entre las distintas membranas sin entrecruzar y entrecruzadas).	54
Figura 34. Módulo de Young de las membranas de colágena-quitósán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento; y de la membrana comercial (ns indica que no existe diferencia significancia entre el control y las diferentes membranas elaboradas y; *** y **** denota que existe diferencia significativa entre las distintas membranas sin entrecruzar y entrecruzadas).	55
Figura 35. Cinética de degradación enzimática de las membranas de colágena-quitósán y de sus componentes puros a) sin y b) con entrecruzamiento; y de la membrana comercial utilizando lisozima.	57
Figura 36. Degradación enzimática de las membranas de colágena-quitósán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento; y de la membrana comercial utilizando lisozima (** indica que existe diferencia significativa entre el control y las diferentes membranas elaboradas y; **** denota que existe diferencia significativa entre las distintas membranas sin entrecruzar y entrecruzadas).	58
Figura 37. Morfología de la membrana C100 a) sin y b) con entrecruzamiento después de 14 días de incubación con la lisozima.	59
Figura 38. Morfología de la superficie de las membranas C0, C25 y C50 sin y con entrecruzamiento.	60
Figura 39. Morfología de la superficie de las membranas C75 y C100 sin y con entrecruzamiento.	61
Figura 40. Morfología de la superficie de la membrana comercial.	62
Figura 41. Morfología de la vista transversal de las membranas C0, C25 y C50 sin y con entrecruzamiento.	63
Figura 42. Morfología de la vista transversal de las membranas C75 y C100 sin y con entrecruzamiento.	64
Figura 43. Morfología de la vista transversal de la membrana comercial.	64
Figura 44. Morfología de la vista transversal de la membrana C100.	65
Figura 45. Morfología de la superficie de una de las capas internas de la membrana C100.	65

Figura 46. Porcentaje de adhesión de las células hFOB en las membranas de colágeno-quitosán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento; y de la membrana comercial después de 4 h de cultivo (** indica que existe diferencia significativa entre el control y las diferentes membranas elaboradas y; ns denota que no existe diferencia significativa entre las distintas membranas sin entrecruzar y entrecruzadas). 67

Figura 47. Viabilidad de las células hFOB sembradas sobre las membranas de colágeno-quitosán y de sus componentes puros a) sin y b) con entrecruzamiento; y de la membrana comercial al día 1, 3, 5, 7 y 14 de cultivo. 68

Figura 48. Morfología de las células hFOB sembradas sobre las membranas C0 y C25 sin y con entrecruzamiento a las 24 h de cultivo. 70

Figura 49. Morfología de las células hFOB sembradas sobre las membranas C50, C75 y C100 sin y con entrecruzamiento a las 24 h de cultivo..... 71

Índice de Tablas

Tabla 1. Artículos sobre membranas a base de colágena tipo I y quitosán en forma de película elaboradas por la técnica de evaporación del disolvente.	15
Tabla 2. Proporciones elegidas de colágena tipo I (Col I) y quitosán (CS) para la elaboración de las membranas.	29
Tabla 3. Concentración de la colágena tipo I (media \pm desviación estándar, n=5).	37
Tabla 4. Espesor de las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento; y de la membrana comercial (media \pm desviación estándar, n=3).	47
Tabla 5. Temperatura de deshidratación de las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento; y de la membrana comercial.	49
Tabla 6. Entalpía de deshidratación de las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento; y de la membrana comercial.	50
Tabla 7. Porcentaje de agua fisisorbida y quimisorbida por las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento; y de la membrana comercial.	51

Glosario de Siglas y Abreviaturas

ASTM	American Society for Testing and Materials (Sociedad Americana para Pruebas y Materiales)
CPD	Critical Point Drying (Secado a Punto Crítico)
MWCO	Molecular Weight Cut Off (Corte de peso molecular)
PAPVD	Plasma Assisted Physical Vapor Deposition (Deposición Física en Fase Vapor Asistida por Plasma)
pH	Potencial de hidrógeno ($\text{pH}=-\log[\text{H}^+]$), medida de acidez o alcalinidad de una disolución
Reactivo ACS	Producto químico que cumple con las especificaciones de la American Chemical Society
TIF	Tipo Inspección Federal
UV	Radiación ultravioleta cuya longitud de onda está comprendida aproximadamente entre los 15 y 400 nm

Glosario de Unidades y Símbolos

%	porcentaje
°C	grado Celsius
cm	centímetro
cm⁻¹	centímetro recíproco
Da	dalton
dL	decilitro
g	gramo
h	hora
J	joule
kDa	kilodalton
kg	kilogramo
kV	kilovolt
L	litro
m	metro

M	molar
m²	metro cuadrado
mA	miliampere
mbar	milibar
mg	miligramo
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MPa	megapascal
MΩ	megaohm
N	newton
N	normal
nm	nanómetro
Pa	pascal
rpm	revoluciones por minuto
U	unidad
u.a.	unidades arbitrarias
UI	unidades internacionales
W	watt
μg	microgramo
μL	microlitro
μm	micrómetro

1. Introducción

La escasa disponibilidad ósea es un problema bastante frecuente en implantología dental. Al perderse un diente, se produce una reabsorción del hueso alveolar que, en algunos casos, dificulta o hace completamente imposible la colocación de implantes. Uno de los requisitos para que una rehabilitación implantosoportada sea exitosa es que el implante esté rodeado de una cantidad adecuada de hueso tanto en anchura como en altura (González *et al.*, 2005).

Con el fin de resolver dichas dificultades, se ha desarrollado la técnica de aumento óseo conocida como “regeneración ósea guiada” que tiene como objetivo favorecer la formación de tejido óseo frente al conectivo y epitelial en el proceso de cicatrización. En este procedimiento, se coloca injerto óseo (hueso descelularizado) en la cavidad dejada por la extracción de una pieza dental y se inserta quirúrgicamente un material de barrera sobre el defecto óseo de relleno, con el fin de 1) impedir que el hueso implantado (que comúnmente se encuentra en forma particulado) se vaya a otro lado y 2) evitar la invasión de la cavidad por células de tejidos conectivos no osteogénicos (González *et al.*, 2014).

Debido a sus propiedades físicas, químicas y biológicas, el material de barrera más usado en implantología son las membranas. De acuerdo con su capacidad de reabsorción, las membranas se clasifican en reabsorbibles y no reabsorbibles. El uso de membranas no reabsorbibles ha demostrado ser una opción terapéutica muy importante en el tratamiento de defectos óseos, sin embargo, la necesidad de una segunda cirugía para su retiro y la alta frecuencia de complicaciones asociadas a su uso, ha producido en los últimos años una disminución en el uso de este tipo de membranas, a favor de las reabsorbibles (González *et al.*, 2005).

Las membranas reabsorbibles pueden ser desarrolladas usando diversos polímeros de origen natural o sintético. Actualmente, los polímeros naturales, como la colágena y el quitosán, han sido ampliamente utilizados en la ingeniería de tejidos debido a que promueven la adhesión, el crecimiento y la diferenciación celular (Shanmugasundaram *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 2010).

La colágena es una proteína fibrosa secretada por las células del tejido conjuntivo (Nelson y Cox, 2005). Es el componente principal de la matriz extracelular y la proteína más abundante en el organismo, su principal función es la de soporte estructural. Hasta el

momento, se conocen 28 tipos de colágenas que difieren en su composición química y estructural. La colágena tipo I se encuentra presente en mayor proporción en piel, tendón y hueso, constituyendo aproximadamente el 25 % de la masa total de proteína en los mamíferos (Alberts *et al.*, 2002). Se le considera uno de los biomateriales más prometedores en la ingeniería de tejidos debido a su biocompatibilidad, degradabilidad y abundante disponibilidad (Han *et al.*, 2010).

El quitosán es un polisacárido catiónico que se encuentra en estado natural en las paredes celulares de algunos hongos, sin embargo, su principal fuente de producción es la hidrólisis de la quitina en medio alcalino a altas temperaturas. La quitina es un polisacárido de alto peso molecular, el cual constituye el material fundamental en los exoesqueletos de crustáceos, algunos insectos y arácnidos. Después de la celulosa, es el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza. El quitosán se caracteriza por su biocompatibilidad, degradabilidad y por sus propiedades anti-microbianas (Hidalgo, 2015).

El uso de la colágena y el quitosán en la ingeniería de tejidos está limitado por su baja estabilidad térmica y alta susceptibilidad a la degradación enzimática (Madhavan *et al.*, 2010). Una alternativa para mejorar estas propiedades fisicoquímicas es mediante el entrecruzamiento químico, el cual promueve la formación de nuevos enlaces covalentes entre las cadenas poliméricas. El N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) es un agente entrecruzante que se ha hecho atractivo debido a que no forma parte del producto final, es decir, la traza química del EDC no queda integrada en las cadenas poliméricas después del entrecruzamiento (Hua *et al.*, 2016).

Por lo anterior, este estudio plantea la elaboración de membranas de colágena-quitosán entrecruzadas con EDC, así como la caracterización fisicoquímica y biológica de éstas para su posible aplicación en la regeneración ósea guiada.

2. Antecedentes

2.1. Regeneración Ósea Guiada

La regeneración tisular guiada (RTG) es una de las estrategias más prometedoras para reparar y regenerar tipos específicos de tejidos como periodonto, defectos óseos alrededor de los dientes o implantes, cresta alveolar atrófica, defectos de furcación, o para preservar los alveolos después de la extracción dentaria (Abou Neel *et al.*, 2013). Cuando se aplica esta estrategia de regeneración de los tejidos para restaurar hueso, se llama regeneración ósea guiada (ROG). El concepto de RTG/ROG aboga por la regeneración de tejidos defectuosos (periodonto o hueso) a través de la utilización de membranas oclusivas que excluye tipos de células indeseables (fibroblastos o células epiteliales), pero permite que las células del tejido progenitor que tiene la capacidad para regenerar los tejidos perdidos (células del ligamento periodontal o células óseas) rellenen el defecto durante la curación (Figura 1). La membrana actúa como una barrera física para evitar que los tejidos de crecimiento rápido (fibrosos o epiteliales) invadan el espacio del defecto, para mantener el espacio y guiar la regeneración de los tejidos defectuosos. La integridad estructural de la membrana debe mantenerse durante la maduración del tejido recién formado y varía de acuerdo a la aplicación, es decir, 4-6 semanas para la RTG de hueso y ligamento periodontal, pero ≥ 6 meses en la ROG para garantizar formación y maduración ósea.

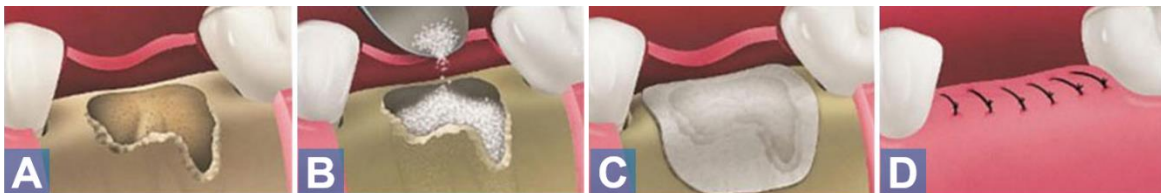


Figura 1. Procedimiento que se lleva a cabo en la técnica de regeneración ósea guiada: a) se extrae el diente y la cavidad dejada por el diente se limpia del tejido infectado e inflamado, b) se coloca injerto óseo en la cavidad, c) se coloca una membrana sobre el injerto para mejorar el crecimiento óseo, y d) se suturan las encías para permitir la curación de los tejidos blandos.

La ROG se puede optimizar mediante enfoques terapéuticos basados en los principios de la osteogénesis, osteoconducción y osteoinducción (Mamalis y Cochran, 2011). La osteogénesis se define como la transferencia directa de elementos celulares vitales a la

zona de regeneración ósea, la osteoconducción tiene como objetivo proporcionar el andamio o sustrato para las células y los procesos bioquímicos que conducen a la formación ósea, y la osteoinducción dirige la diferenciación de células troncales mesenquimales (MSC) a células comprometidas en secretar componentes que son los únicos presentes en el tejido óseo maduro diferenciado totalmente. Una gran cantidad de técnicas se han aplicado para maximizar los beneficios de esos procedimientos. Tales técnicas pueden implicar el uso de factores de crecimiento y diferenciación, injertos óseos en bloque o particulados, además de membranas de barrera (MB).

El proceso de regeneración que ocurre dentro de la MB, implica angiogénesis y migración de células osteogénicas desde la periferia hacia el centro del defecto para crear un tejido de granulación bien vascularizado (Dimitriou *et al.*, 2012). La organización inicial del coágulo sanguíneo es seguida por crecimiento vascular y deposición de tejido óseo, formación de hueso laminar posterior y, finalmente, la remodelación, que se asemeja al crecimiento óseo. Cuando el crecimiento hacia la médula del hueso en el defecto óseo se ha obstaculizado o demorado, la regeneración de este tejido también se retrasa. Sin embargo, en defectos grandes, la formación ósea se produce sólo en la zona marginal estable con una zona central de tejido conectivo laxo desorganizado, y por lo tanto, se requiere del uso adicional de materiales de injerto óseo, que actúan como un andamio para la osteoconducción y como fuente osteogénica y de sustancias osteoinductivas para la formación de hueso laminar.

Las membranas requieren flexibilidad para adaptarse a la forma del defecto y resistencia para mantener el espacio en la formación ósea y para conectar con los tejidos blandos (Ji *et al.*, 2013; Kazakos *et al.*, 2011). La ROG con empleo de MB es una manera de prevenir la invasión de los tejidos blandos en defectos óseos (Kazakos *et al.*, 2011).

El uso de una membrana en ROG es ventajoso, permite la estabilización mecánica y la prevención de micromovimientos del material de injerto óseo. El uso de injerto de hueso autógeno combinado con una membrana para la ROG brinda resultados clínicos positivos y predecibles (De Marco *et al.*, 2012).

2.2. Membranas de Barrera

Las características básicas de una membrana ideal son la biocompatibilidad, oclusividad celular, mantención del espacio y la integración a los tejidos (Dimitriou *et al.*, 2012). Una

MB ideal es un biomaterial que puede servir durante un periodo prolongado y se integra con el tejido blando circundante después de la ROG (Ghanaati, 2012). Se ha postulado que se tarda 4 semanas para lograr la integridad estructural de las membranas en la regeneración periodontal, mientras que un periodo más largo, es decir, hasta 6 meses, ha sido recomendado para la ROG. La MB reduce la resorción ósea osteoclástica y previene la invasión de células indeseables en el defecto óseo durante su reparación (Yang *et al.*, 2014). Ésta debe tener características tales como biocompatibilidad, integración al tejido, oclusividad celular, mantenimiento del espacio, estabilidad, facilidad de uso y degradación ajustable (Yang *et al.*, 2014; Dung *et al.*, 2014). Las membranas requieren suficiente flexibilidad para adaptarse a la forma del defecto óseo y rigidez para mantener el espacio para la ROG (Kharaziha *et al.*, 2013).

Numerosas MB se han desarrollado para llevar a cabo una gran variedad de funciones en aplicaciones clínicas, que se pueden agrupar en membranas reabsorbibles o no reabsorbibles (Rakhmatia *et al.*, 2013). Las propiedades físicas de las membranas influyen en su función, y la selección de un material específico se basa en las propiedades biológicas de la membrana, así como los requisitos de tratamiento, teniendo ventajas y desventajas inherentes.

2.2.1. Membranas Reabsorbibles

Los materiales reabsorbibles que se utilizan como membranas pertenecen a los grupos de los polímeros naturales o sintéticos. De estos, la colágena y poliésteres alifáticos, como el poliglicólido, son mejor conocidos por su aplicabilidad médica.

Los materiales reabsorbibles ofrecen la ventaja de ser degradados por el cuerpo, eliminando así la necesidad de una segunda cirugía para su extracción. Por esta razón se reduce la morbilidad y el riesgo de daño tisular.

Las proteínas son componentes primarios de los tejidos y órganos, y han sido usadas para varias aplicaciones médicas (Ko *et al.*, 2013). La colágena es la proteína más abundante en los mamíferos y ha sido empleada como biomaterial por el fácil procesamiento y la capacidad de inducir una respuesta inflamatoria e inmune mínima.

Las membranas de colágena, de las cuales la mayoría están hechas de los tipos I y III, tienen ventajas tales como: acción quimiotáctica de fibroblastos, propiedad hemostática, inmunogenicidad débil y adhesión osteoblástica; que poseen gran interés para la ROG

(Figura 2) (Abou Neel *et al.*, 2013). Hay diferentes tipos disponibles en el mercado, los cuales varían según el tipo, la estructura, el grado de reticulación química y tratamiento de la colágena. Independientemente de la buena biocompatibilidad de las membranas de colágena, el colapso y la degradación rápida de éstas compromete la cantidad de nuevo tejido. Esta membrana se reabsorbe por degradación enzimática a través de colagenasas (proteasas), macrófagos (enzimas derivadas de leucocitos polimorfonucleares) y proteasas bacterianas. La reticulación de la membrana de colágena y el uso de antibióticos, son eficaces en la reducción de su degradación por este tipo de enzimas.



Figura 2. Membrana de colágena (Neomem® FlexPlus).

Otra de las modalidades de membranas absorbibles, es la membrana derivada del pericardio humano, la cual se ha usado ampliamente para la regeneración de las zonas de defecto óseo cerca de los implantes o como una MB en las perforaciones del seno maxilar (Ahn *et al.*, 2012).

2.2.2. Membranas No Reabsorbibles

Dentro de estas se encuentran el politetrafluoroetileno (PTFE) y la malla de titanio (Rakhmatia *et al.*, 2013; Pinto *et al.*, 2011). Un inconveniente en el uso de este tipo de membranas es la necesidad de su extracción con un procedimiento quirúrgico. Sin embargo, estas membranas ofrecen una función de barrera eficaz en términos de biocompatibilidad, pueden mantener el espacio durante un periodo suficiente, son más predecibles en su comportamiento, tienen un menor riesgo de complicaciones a largo plazo y son sencillas de manipular clínicamente.

2.2.2.1. Membrana de PTFE expandido (e-PTFE)

De acuerdo con su estructura, el PTFE se puede dividir en dos tipos: e-PTFE y de alta densidad (d-PTFE). La membrana de e-PTFE posee numerosos poros pequeños, que fomentan la unión de células del tejido (Figura 3). Estos poros pequeños también actúan para restringir la migración de células epiteliales. Sin embargo, este material requiere de su extracción quirúrgica, que puede exponer la membrana a las bacterias. Además, este material debe ser removido inmediatamente en caso de inflamación (Rakhmatia *et al.*, 2013).



Figura 3. Membrana de politetrafluoroetileno expandido (Cytotflex® TEF-Guard).

Independientemente de las altas propiedades mecánicas de las membranas poliméricas, la biocompatibilidad y la afinidad celular son todavía un problema importante (Abou Neel *et al.*, 2013).

El e-PTFE ha sido utilizado con éxito como una MB para los procedimientos de regeneración (Carbonell *et al.*, 2014). Sin embargo, cuando se expone a la cavidad bucal, su alta porosidad aumenta el riesgo de infección temprana, que puede afectar a los resultados quirúrgicos.

2.2.2.2. Membranas de d-PTFE

Es una alternativa al e-PTFE. Debido a la alta densidad y tamaño de poro pequeño, la infiltración de bacterias en el sitio de aumento de hueso se elimina, lo que protege el material de injerto subyacente y/o implante. Por otra parte, no es necesario cerrar los tejidos primarios. La d-PTFE bloquea completamente la penetración de alimentos y

bacterias, y por lo tanto, incluso si se expone a la cavidad bucal, todavía actúa como una barrera adecuada.

2.2.2.3. Malla de Titanio

La malla de titanio tiene una excelente estabilidad mecánica, biocompatibilidad y capacidad de manejo clínico (Figura 4) (Song *et al.*, 2011). El titanio se ha utilizado ampliamente en numerosas aplicaciones quirúrgicas, debido a su alta resistencia y rigidez, baja densidad y bajo peso, capacidad para resistir altas temperaturas y resistencia a la corrosión. Ofrece una excelente solución para la ROG sobre otros tipos de membrana. Estudios clínicos preliminares han mostrado también su carácter predecible, tanto en el aumento óseo horizontal como en el vertical (Rakhmatia *et al.*, 2013).



Figura 4. Malla de titanio (Salvin®).

2.3. Polímeros Sintéticos y Naturales

Los polímeros sintéticos son atractivos para su uso en ingeniería de tejidos debido a que sus propiedades mecánicas, estructurales y fisicoquímicas pueden ser fácilmente controladas y reproducidas en el laboratorio mediante la modificación de la estructura química del polímero precursor y la reacción de polimerización. Entre los materiales sintéticos más usados para la formación de andamios se encuentran: el polietilenglicol, poli(óxido de etileno), poli(fumarato de propileno) y poli(alcohol vinílico) (PEG, PEO, PPF y PVA, por sus siglas en inglés respectivamente) (Lee y Mooney, 2001; Drury y Mooney, 2003).

Asimismo, los polímeros sintéticos poseen una mejor estabilidad térmica y sus propiedades mecánicas son superiores en comparación con algunos polímeros naturales; sin embargo, la mayoría de ellos no promueven la adhesión celular, no se degradan bajo

condiciones fisiológicas y pueden incluir residuos de iniciadores u otros componentes o impurezas que alteren el crecimiento celular (Sionkowska, 2013).

A diferencia de los polímeros sintéticos, los polímeros de origen natural se han usado con mayor frecuencia como andamios celulares debido a que han demostrado ser biocompatibles, degradables bajo condiciones fisiológicas y promueven la interacción celular. Esto se debe a que la mayoría de los polímeros naturales poseen propiedades macromoleculares similares a la matriz extracelular o bien son componentes de ella (Drury y Mooney, 2003).

La principal desventaja de los polímeros naturales es que generalmente presentan un intervalo muy limitado de propiedades mecánicas y exhiben variaciones significativas tanto en sus propiedades mecánicas como fisicoquímicas. Algunos de los polímeros naturales más empleados incluyen proteínas como la colágena y la gretina; glicosaminoglicanos como el ácido hialurónico y el sulfato de condroitina; o polisacáridos como la celulosa, el alginato, la agarosa y el quitosán (Lee y Mooney, 2001).

2.4. Colágena

La colágena es una proteína estructural abundante en vertebrados. En humanos, comprende un tercio del total de proteínas y es el componente predominante del tejido conectivo de los cartílagos, huesos, tendones y de la piel (Vázquez *et al.*, 2010).

El término “colágena” es usado como un término genérico para abarcar a una gran familia de distintas proteínas, cada una con estructuras, funciones y distribución en tejidos en la matriz extracelular específicos. Veintiocho tipos de colágena genéticamente distintas han sido identificados. Cada tipo está constituido por un conjunto de tres cadenas polipeptídicas α , cada una de las cuales es una hélice levógira agrupadas en una estructura helicoidal dextrógira con tres residuos de aminoácidos por vuelta (Figura 5) (Ramshaw *et al.*, 2009).

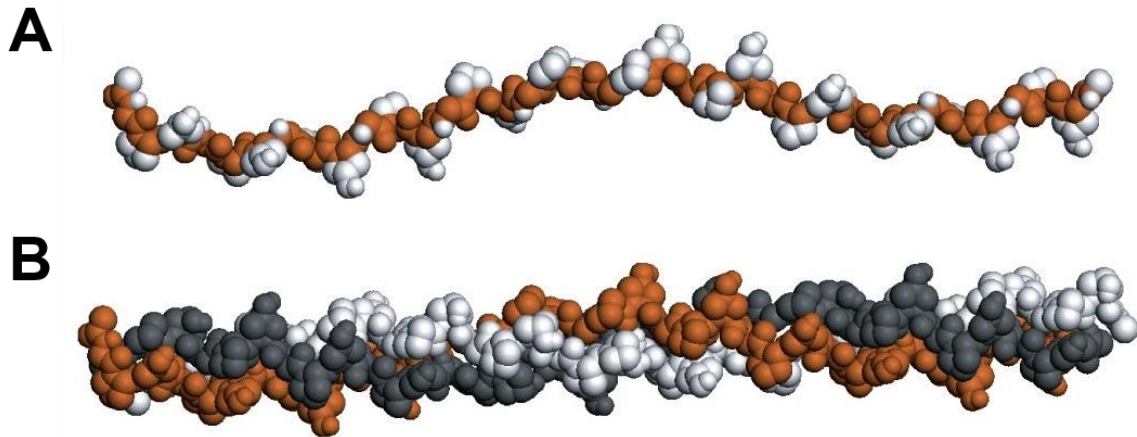


Figura 5. a) Cadena alfa y b) triple hélice de la colágena (Lodish *et al.*, 2007).

La composición de aminoácidos de las colágenas es característica de estas proteínas: glicina 33 %, prolina 12-20 %, hidroxiprolina 10 % e hidroxilisina en menor proporción. Las tres cadenas α que constituyen a las colágenas se caracterizan por la presencia de repeticiones del triplete Gly-X-Y, donde X es frecuentemente prolina y Y es frecuentemente hidroxiprolina.

La nomenclatura de los tipos de colágena se basa en la estructura de los dominios homólogos y son asignados números romanos del I-XXVIII basándose en el orden cronológico de descubrimiento. Las colágenas más abundantes son la colágena tipo I (hueso, ligamento, piel, tendón), la colágena tipo II (cartílago, humor vítreo, meniscos), la colágena tipo III (intestino, piel, vasos sanguíneos) y la colágena tipo IV (membranas basales) (Shoulders y Raines, 2010).

La colágena tipo I es frecuentemente elegida como el andamio por excelencia para implantes degradables, debido a que es el componente mayoritario del tejido conjuntivo además de que juega una gran variedad de roles en diferentes tejidos. El hecho de que la colágena presente una baja antigenicidad y una alta biocompatibilidad, contribuye a su elección en la fabricación de andamios con aplicaciones biomédicas. Su versatilidad y facilidad de manufactura ha permitido su fabricación en numerosas formas diferentes, como son, esponjas, películas, soluciones inyectables, hidrogeles, entre otros (Cen *et al.*, 2008).

2.5. Quitosán

El quitosán (poli- β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glucosa), es un polisacárido catiónico que se encuentra en estado natural en las paredes celulares de algunos hongos, sin embargo, su principal fuente de producción es la hidrólisis de la quitina en medio alcalino a altas temperaturas (Figura 6). La quitina (poli- β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa), es un polisacárido de alto peso molecular, el cual constituye el material fundamental en los exoesqueletos de crustáceos, algunos insectos y arácnidos. Después de la celulosa, es el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza (Lárez, 2003; Devlieghere *et al.*, 2004).

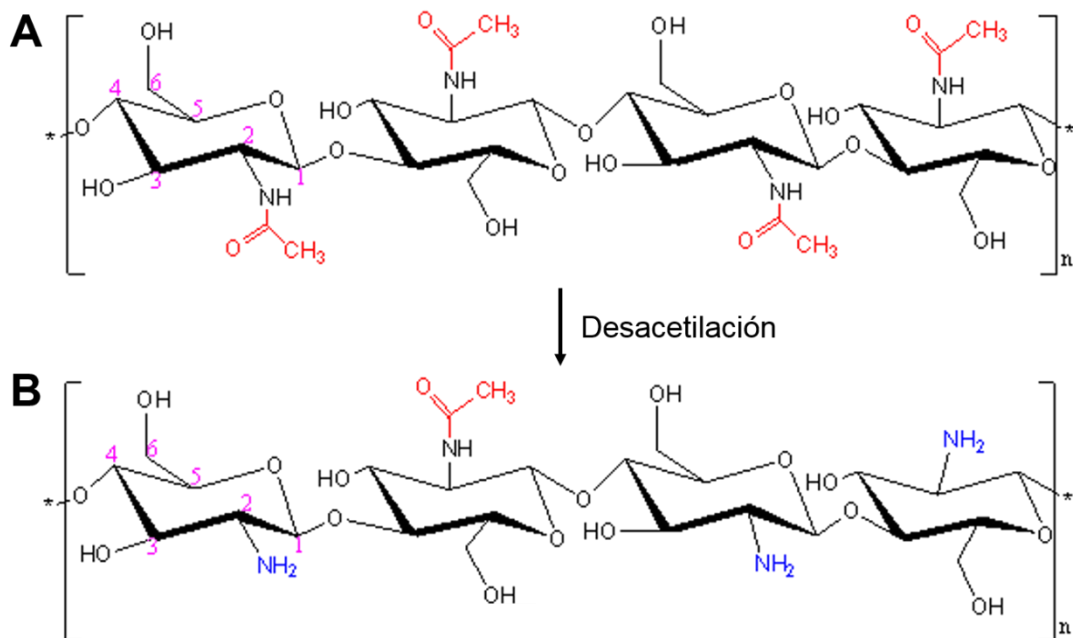


Figura 6. Estructura química de a) la quitina y b) el quitosán. La principal fuente de producción de quitosán es la hidrólisis de la quitina en medio alcalino a altas temperaturas (Olteanu y Enescu, 2007).

Debido a su estructura química, la quitina es completamente insoluble en agua o en medio ácido, pero su desacetilación parcial produce la formación del quitosán, un polisacárido lineal con distintas proporciones de unidades de quitina y quitosán, cuya relación depende de las condiciones de reacción. Los grupos amino libres del quitosán permiten que sea soluble en agua acidificada, lo que lo hace que tenga una gran diversidad de presentaciones (geles, hilos, películas, membranas, esferas, entre otras.).

Además, el quitosán es biocompatible, degradable, no tóxico, anti-microbiano y estructuralmente similar a los glicosaminoglicanos. Es por eso, que el quitosán ha sido ampliamente usado en diversas aplicaciones biomédicas, entre ellas: fabricación de suturas, como agente liberador de fármacos, piel artificial, en la regeneración de hueso, cartílago, nervios y vasos sanguíneos (Muzzarelli y Muzzarelli, 2005; Nandagiri, 2013).

2.6. Entrecruzamiento

En la ingeniería de tejidos, los andamios celulares necesitan ser resistentes a una combinación de esfuerzos químicos y mecánicos, por lo cual es necesario estabilizarlos. El entrecruzamiento o reticulación de su red polimérica es una manera de lograrlo, pudiéndose llevar a cabo de dos formas: una de ellas consiste en someter el andamio a distintos procesos físicos, mientras la segunda implica el uso de agentes químicos.

En el entrecruzamiento físico, la unión entre cadenas se debe a enlaces secundarios débiles tales como fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, enmarañamiento entre cadenas poliméricas, cristalización, entre otras (Figura 7a). Debido a ello, los andamios presentan una red polimérica tridimensional formada por uniones que no son completamente estables y pueden ser disueltos si se altera la temperatura, el pH, y/o la fuerza iónica del medio en el que se encuentren inmersos (Li, 2004; Omidian y Park, 2010).

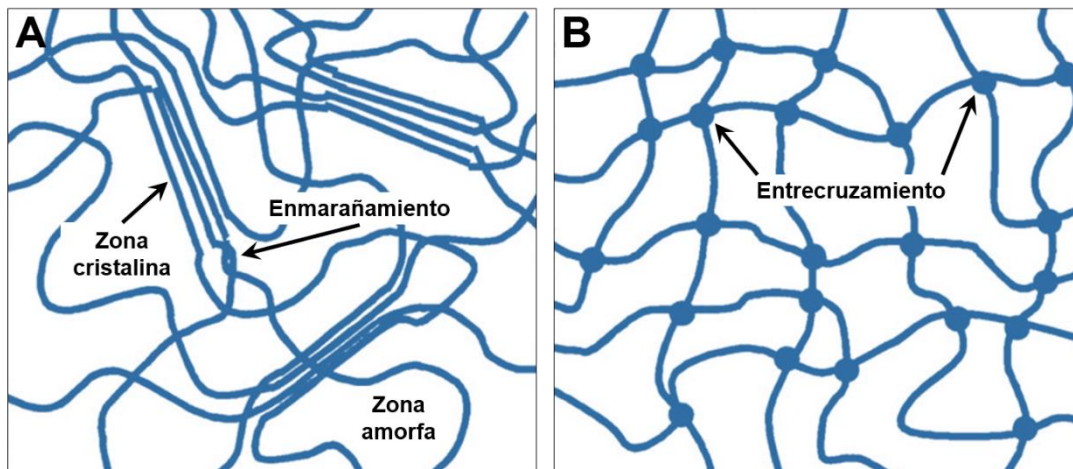


Figura 7. Representación esquemática de las redes poliméricas entrecruzadas a) físicamente y b) químicamente (Figura modificada de Li, 2004).

Por el contrario, en el entrecruzamiento químico, la reticulación es a causa de la formación de enlaces covalentes entre los grupos funcionales de las cadenas poliméricas del andamio (Figura 7b). Esto gracias a la acción de un agente entrecruzante. Los agentes entrecruzantes, son moléculas bifuncionales o multifuncionales de bajo peso molecular, que estabilizan a los andamios debido a la unión o enlace entre los grupos funcionales presentes en el sistema. Estos andamios poseen una estructura polimérica mucho más rígida y no pueden ser disueltos en agua u otros disolventes a menos que el enlace covalente sea roto (Borzacchiello y Ambrosio, 2009).

Algunos ejemplos de agentes entrecruzantes son el glutaraldehído, el formaldehído, las carbodiimidas, en especial el N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), y la genipina, los cuales se han utilizado con cierto grado de éxito. El glutaraldehído ha sido el agente entrecruzante más ampliamente utilizado. Sin embargo, biomateriales entrecruzados con este agente han mostrado una liberación de glutaraldehído monomérico tóxico tras la hidrólisis del material. Con el fin de evitar los problemas relacionados con toxicidad, es necesario elegir un agente entrecruzante de longitud cero, es decir, que su estructura química no forme parte del producto final y así evitar afectar negativamente las características biológicas de los polímeros (Madhavan *et al.*, 2010).

Las carbodiimidas cumplen con esta característica. En presencia de una amina, las carbodiimidas promueven la formación de un enlace amida en dos pasos (Figura 8). En la reacción inicial, el grupo carboxílico se adhiere a la carbodiimida para formar un producto intermedio, la o-acilisourea. En la segunda reacción, el grupo amino de otra subunidad de polímero se une al intermediario reactivo. De esta manera el polímero queda entrecruzado y se obtiene un subproducto soluble en agua, la isourea (Angele *et al.*, 2004).

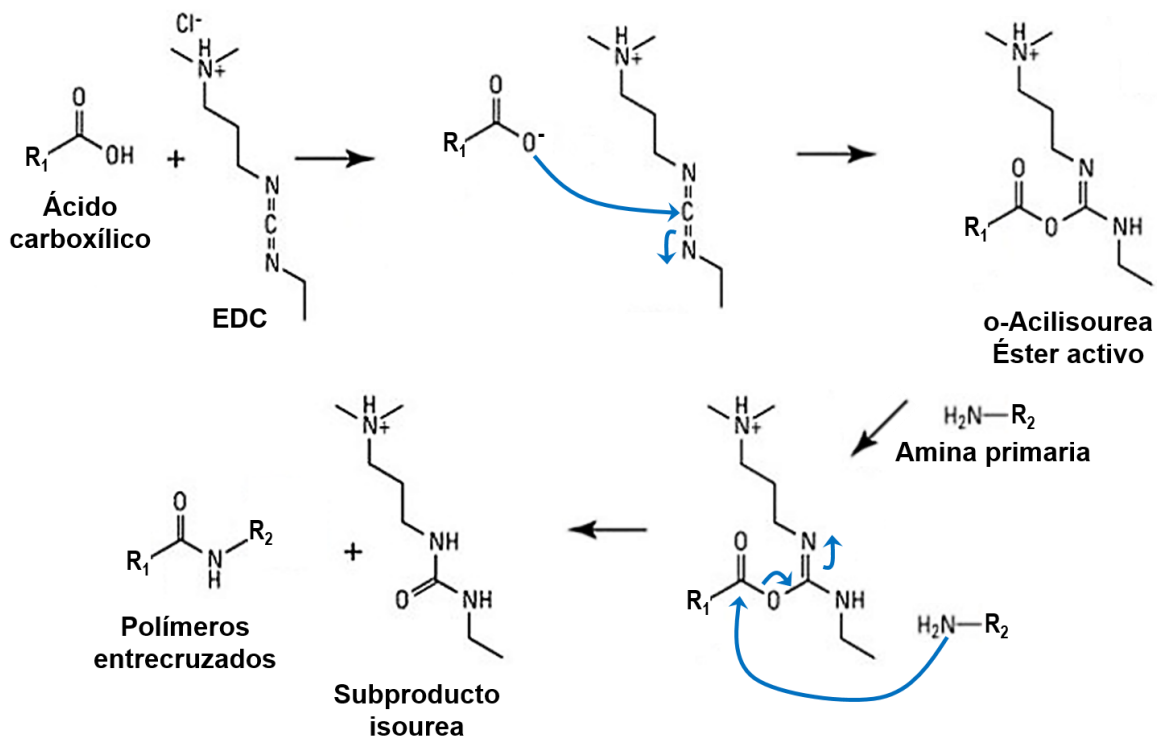


Figura 8. Esquema de la reacción de entrecruzamiento con EDC. Las moléculas R_1 y R_2 pueden ser péptidos, proteínas o cualquier sustancia química que tenga grupos carboxilo y amina primaria (Figura modificada de Thermo Scientific, 2017).

2.7. Membranas de Colágena Tipo I y Quitosán

En la Tabla 1 se muestran algunos trabajos que se encontraron sobre membranas a base de colágena tipo I y quitosán en forma de película elaboradas por la técnica de evaporación del disolvente. En esta tabla, se puede observar que este tipo de membranas se han entrecruzado químicamente usando agentes como el formaldehído y el EDC. A pesar de que existen estudios relacionados con membranas de colágena-quitosán entrecruzadas con EDC, es importante mencionar que estas membranas se han desarrollado para diferentes aplicaciones. Por ejemplo, Li *et al*, 2014 las han estudiado para la regeneración de córnea y, Wang *et al.*, 2003 para la regeneración de hígado. Debido a que las membranas requieren diferentes propiedades de acuerdo con su aplicación, en este trabajo se estudian este tipo de membranas para ser utilizadas en la regeneración ósea guiada. Igualmente, es importante mencionar que algunos de estos autores no establecen una comparación entre las membranas entrecruzadas y las que no se entrecruzaron con EDC, por lo que en el presente estudio se plantea esta comparación

con el fin de conocer el efecto del entrecruzamiento con este agente químico. Además, en este trabajo, aparte de que las membranas se caracterizaron mediante algunas técnicas fisicoquímicas muy similares a las reportadas por estos autores, también se evaluó la capacidad de absorción de PBS, la estabilidad térmica, la velocidad de degradación y la biocompatibilidad usando osteoblastos fetales humanos.

Tabla 1. Artículos sobre membranas a base de colágena tipo I y quitosán en forma de película elaboradas por la técnica de evaporación del disolvente.

Componentes	Proporciones (%)	Entrecruzamiento	Caracterización fisicoquímica y biológica	Referencia
Colágena tipo I/ quitosán	33:66 50:50 100:0	Ninguno	FTIR Absorción de agua Ángulo de contacto	Ungureanu <i>et al.</i> , 2015
Colágena tipo I/ quitosán	0:100 15:85 30:70 45:55 60:40 100:0	EDC	FTIR Ensayo mecánico SEM Biocompatibilidad Ángulo de contacto	Li <i>et al.</i> , 2014
Colágena tipo I/ quitosán	0:100 20:80 80:20 100:0	Ninguno	Absorción de agua DSC SEM AFM	Zamora <i>et al.</i> , 2010
Colágena tipo I/ quitosán	0:100 50:50 100:0	EDC	FTIR Ensayo mecánico Biocompatibilidad	Wang <i>et al.</i> , 2003
Colágena tipo I/ quitosán	66:33 80:20 90:10 100:0	Formaldehído	Absorción de agua DSC Ensayo mecánico	Zhang <i>et al.</i> , 1996

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Obtener membranas a base de colágena tipo I y quitosán entrecruzadas con EDC, evaluar sus propiedades fisicoquímicas y biológicas para su posible aplicación en la regeneración ósea guiada.

3.2. Objetivos Específicos

1. Extraer, purificar y caracterizar la colágena tipo I y el quitosán por métodos fisicoquímicos.
2. Obtener membranas a diferentes proporciones de colágena-quitosán por la técnica de evaporación del disolvente y entrecruzarlas con EDC.
3. Caracterizar fisicoquímicamente a las membranas para conocer su composición química, capacidad de absorción de PBS, estabilidad térmica, respuesta mecánica, velocidad de degradación y morfología.
4. Caracterizar biológicamente a las membranas con osteoblastos fetales humanos para conocer la adhesión, viabilidad y morfología celular.

4. Metodología

4.1. Materiales y Equipos

4.1.1. Reactivos

- Tendón de bovino adquirido de un rastro TIF
- Acetona, reactivo ACS, 99.7 %, *J.T. Baker*
- Agua desionizada (H_2O_{di}), 18.2 M Ω ·cm a 25 °C, <1 μ g/L, *Simplicity*
- Ácido acético glacial (HAc), reactivo ACS, 99.9 %, *J.T. Baker*
- Pepsina de mucosa gástrica porcina, 800-2500 U/mg, *Sigma-Aldrich*
- Cloruro de sodio (NaCl), 99.5 %, *Productos Químicos Monterrey, S.A.*
- Ácido clorhídrico (HCl), reactivo ACS, 36.5-38 %, *J.T. Baker*
- Hidróxido de sodio (NaOH), hojuelas de 3 mm, 97 %, *Sigma-Aldrich*
- Hidroxiprolina (Hyp), *Sigma*
- Ácido cítrico monohidratado, Reactivo ACS, 99.6 %, *J.T. Baker*
- Acetato de sodio trihidratado (NaAc), reactivo ACS, *Sigma*
- Cloramina T trihidratada, 97.5 %, *Mallinckrodt Chemicals*
- 2-Metoxietanol, reactivo ACS, 99.3 %, *Aldrich*
- Ácido perclórico ($HClO_4$), reactivo ACS, 70 %, *Sigma-Aldrich*
- 4-(Dimetilamino)benzaldehído, *Hycel Reactivos Químicos*
- Buffer de muestra de Laemmli, 2x, *Bio-Rad*
- Acrilamida/bis-acrilamida, 30 % T, 2.67 % C, *Sigma-Aldrich*
- Tris(hidroximetil)aminometano (Tris-base), ≥ 99 %, *Sigma*
- Dodecilsulfato de sodio (SDS), ≥ 98.5 %, *Sigma*
- Persulfato de amonio (APS), ≥ 98 %, *Sigma*
- *N,N,N',N'*-Tetrametildiaminometano (TEMED), *J.T. Baker*
- Buffer de Tris/Glicina/SDS, 10x, *Bio-Rad*
- Azul de Coomassie, R-250
- Metanol (MeOH), reactivo ACS, 99.9 %, *J.T. Baker*
- Marcador de pesos moleculares, *Precision Plus ProteinTM Standards, Dual Color, Bio-Rad*
- Estándar de colágena tipo I de bovino, 1 %, *DSM Nutritional Products Ltd.*

- Clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), ≥98 %, *Sigma-Aldrich*
- Buffer fosfato salino (PBS), pH 7.4 ± 0.2, 25 °C, *MBL® BION*
- Lisozima de huevo de gallina, 95 %, 46 400 U/mg, *Sigma*
- Etanol (EtOH), alcohol reactivo para HPLC, *Sigma-Aldrich*
- Osteoblastos fetales humanos (hFOB), 1.19, *ATCC® CRL-11372™*
- Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), *Gibco*
- Suero fetal bovino (FBS), *Gibco*
- Sal sódica de penicilina G, ≥98 %, *Fluka*
- Sulfato de estreptomicina, 772 U/mg, *Sigma*
- Fungizona, *Gibco*
- L-Glutamina, 99-100 %, *Sigma*
- Cristal violeta, *Sigma*
- *p*-Formaldehído (PFA), *Sigma*
- Agua bidestilada (H₂O_{bi})
- Kit de conteo celular-8 (CCK-8), *Sigma*
- Tetraóxido de osmio (OsO₄), *Sigma*
- Tripsina-EDTA, 0.25 %, 1x, *Gibco*
- Azul de tripano, 0.4 %, *Sigma*
- Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI), *Difco*

4.1.2. Equipos

- Ultracongelador *Thermo Scientific Forma*
- Liofilizadora *Labconco Free Zone 1*
- Triturador *Nutribullet®*
- Balanza analítica *Sartorius M-Power*
- Centrífuga *Eppendorf 5810 R F-34-6-38*
- Mufla *Thermolyne 48000 Furnace*
- pHmetro *Hanna Instruments HI223*, equipado con un electrodo *Hanna Instruments HI1131*
- Lector de placas de ELISA *BioTek® Epoch*
- Cámara de electroforesis *Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell*
- Fuente de poder *Bio-Rad PowerPac™ HC*
- Sistema de documentación de geles *Bio-Rad ChemiDoc™ XRS+*

- Estufa de desecación *Indelab*
- Espectrómetro FTIR-ATR *Bruker Alpha Platinum*
- Incubadora *Thermo Scientific 3422*
- Equipo termogravimétrico *TA Instruments Q5000IR*
- Calorímetro diferencial de barrido *TA Instruments Q2000*
- Micrómetro *Mitutoyo 293-725-30*
- Texturómetro *Brookfield CT3TM*
- Equipo de secado a punto crítico *Polaron*
- Sistema de recubrimiento para SEM *Polaron*
- Microscopio electrónico de barrido *JEOL JCM-6000*
- Baño de flotación *Fisher 134*
- Microscopio óptico invertido *Invertscope^{MR} SI-PH*
- Cámara de Neubauer *Boeco*

4.2. Extracción, Purificación y Caracterización de la Colágena Tipo I

La preparación de la colágena involucra generalmente varias etapas, que van desde: a) la adquisición del tejido de donde se va a extraer, b) el aislamiento de la proteína junto con los otros componentes de la matriz extracelular en un medio adecuado, y c) su purificación por los sistemas selectivos (Krotzsch, 1992). En este trabajo, la extracción y purificación de la colágena tipo I se realizó en base a una modificación al método de Miller y Rhodes, 1982.

El análisis de la colágena se puede llevar a cabo de dos maneras: a) la cuantitativa, que utiliza principalmente un método donde se hace reaccionar el aminoácido característico de la proteína (hidroxiprolina) en forma oxidada con el 4-(dimetilamino)benzaldehído para dar un compuesto colorido que se lee en el espectro de luz visible empleando un espectrofotómetro UV-visible; y b) la cualitativa, que se refiere a los tipos de colágena contenidos en la muestra y que generalmente se evalúa por electroforesis en gel de poliacrilamida (Krotzsch, 1992).

4.2.1. Extracción

El tejido biológico empleado para la extracción de la colágena fue tendón de Aquiles de origen bovino. El tendón se limpió (retirando el exceso de grasa y sangre) y se cortó en fragmentos pequeños, después se sumergió en acetona y se refrigeró (4 °C) por 12 h. Luego se lavó con agua desionizada para retirar el tejido adiposo y se liofilizó a una temperatura de -50 °C y a una presión de 0.05 mbar por 12 h para remover la fase líquida de la sólida.

El proceso de extracción y purificación se llevó a cabo a una temperatura de 4 °C para evitar el crecimiento microbiano. El tendón liofilizado se mezcló con HAc 0.5 M empleando un triturador, con lo que se formó una disolución viscosa debido al hinchamiento de las fibras por el medio ácido.

La mezcla de extracción se centrifugó a 9500 rpm por 1 h para separar el tejido no disgregado, el cual se volvió a mezclar con ácido para después volverse a centrifugar para obtener un mayor rendimiento.

Por último, se adicionó la pepsina en una relación 1:10 (masa de la enzima:masa del tendón liofilizado) y se agitó a 600 rpm por 12 h para desprender las secuencias de aminoácidos terminales de la proteína (telopéptidos) y evitar una posible respuesta inmunológica. La Figura 9 muestra el cuadro metodológico del proceso de extracción.

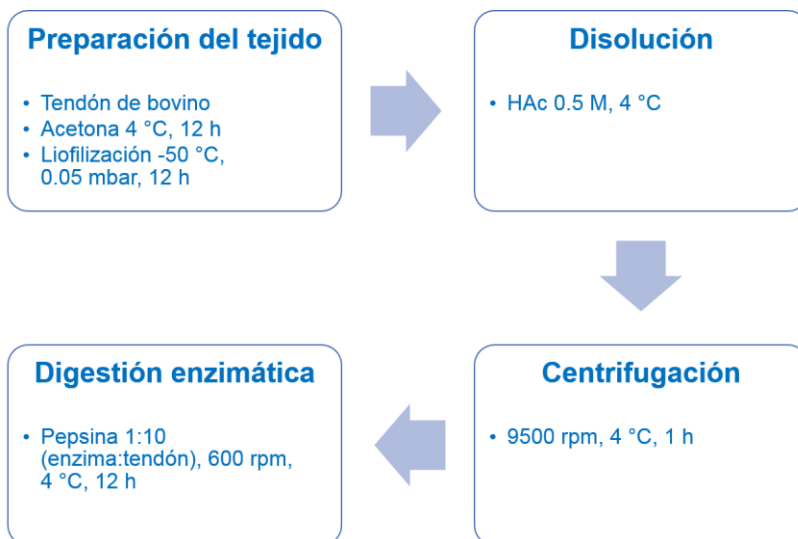


Figura 9. Cuadro metodológico del proceso de extracción de la colágena tipo I.

4.2.2. Purificación

En esta etapa se aisló la colágena tipo I del extracto obtenido del proceso anterior. La purificación inició con una primera precipitación adicionando cristales de NaCl hasta llegar a una concentración 2 M y se agitó a 300 rpm por 12 h para separar la proteína de otros componentes no proteicos. La mezcla se centrifugó a 8500 rpm por 1 h y se disolvieron los botones (sedimento o precipitado) en HAc 0.5 M a 300 rpm por 24 h (purificación inicial). Después se repitieron los pasos anteriores de precipitación y disolución una vez más con la diferencia en que para la segunda precipitación se adicionaron cristales de NaCl hasta llegar a una concentración de 0.7 M para aislar selectivamente la colágena tipo I de otros tipos de proteína en la fracción purificada (purificación selectiva). Por último, la disolución se dializó con agua desionizada por 12 h y HAc 5 mM por 24 h empleando membranas semipermeables (MWCO 3.5 kDa, *Spectra/Por*[®] 3, *Spectrum Laboratories, Inc.*) para retirar las sales que pudieron haberse quedado en las precipitaciones. La Figura 10 muestra el cuadro metodológico del proceso de purificación.



Figura 10. Cuadro metodológico del proceso de purificación de la colágena tipo I.

4.2.3. Cuantificación

La concentración de la colágena tipo I se determinó a partir de la cuantificación de la hidroxiprolina presente en las muestras de acuerdo con el método de Woessner, 1961, debido a que este aminoácido se encuentra exclusivamente en este tipo de proteínas (colágenas). Este método se basa en la reacción del 4-(dimetilamino)benzaldehído con la hidroxiprolina a través de un proceso de oxidación. El mecanismo químico de este proceso se puede describir de la siguiente manera. La estructura de este aminoácido contiene un anillo de pirrolidina (Figura 11a) que mediante una deshidrogenación oxidativa da lugar a un anillo de pirrol, el cual puede identificarse posteriormente usando una reacción con el 4-(dimetilamino)benzaldehído (Ignat'eva *et al.*, 2007). El compuesto quinoide resultante se colorea intensamente (el color depende de los sustituyentes y varía de naranja a lila) (Figura 11b).

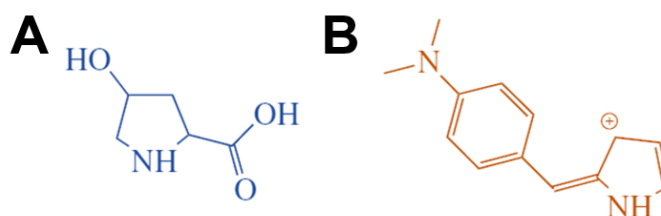


Figura 11. a) Estructura de la hidroxiprolina y b) compuesto quinoide (Ignat'eva *et al.*, 2007).

La cloramina T se usa como un agente oxidante. Entre las ventajas de este agente se encuentran su bajo costo, la facilidad de descomposición de su exceso y la ausencia de productos de reducción coloreados. La reacción de oxidación se realiza en una disolución buffer con pH~6. Debido a que el 4-(dimetilamino)benzaldehído es insoluble en agua al pH dado, se añade al sistema 2-metoxietanol que es fácilmente miscible con agua.

Debido a que el 4-(dimetilamino)benzaldehído se puede oxidar por la cloramina T, un exceso de este último se descompone mediante la adición de HClO_4 .

El protocolo para la cuantificación de hidroxiprolina se describe detalladamente a continuación. Se colocaron 0.2 g de la colágena tipo I líquida en una ampolleta por quintuplicado, cada muestra se llevó hasta 1 g agregando HCl 6 N y se sellaron las ampolletas con calor. Las muestras se hidrolizaron a $105\text{ }^\circ\text{C}$ por 18 h empleando una mufla. Después las ampolletas se abrieron y el contenido se vertió en matraces aforados de 10 mL. Luego las disoluciones se ajustaron a un pH neutro (empleando NaOH y HCl) y se aforaron con NaCl 0.2 M. De las disoluciones anteriores, se tomaron 0.2 mL de cada muestra y se llevaron hasta 1 mL adicionando NaCl 0.2 M (Muestras A).

Para construir la recta de calibración, se tomaron 0.1 mL de hidroxiprolina 1 mg/mL, se colocaron en un matraz aforado de 10 mL y se aforó con NaCl 0.2 M. De la disolución anterior, se tomaron 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 y 0.6 mL y se llevaron hasta 1 mL agregando NaCl 0.2 M (Muestras B).

Posteriormente a las muestras A y B se les colocó 0.5 mL de cloramina T (Apéndice 8.1.1.) y se incubaron a $25\text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min. Después se les agregó 0.5 mL de HClO_4 3.15 N y se incubaron a $25\text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min. Luego se les adicionó 0.5 mL de 4-(dimetilamino)benzaldehído, se colocaron en un baño de agua a $60\text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min y se dejaron enfriar por 5 min. Por último, se tomaron 0.2 mL de cada una de las muestras por triplicado, se colocaron en una microplaca y se midió la absorbancia a 557 nm empleando un lector de placas de ELISA (Figura 12).

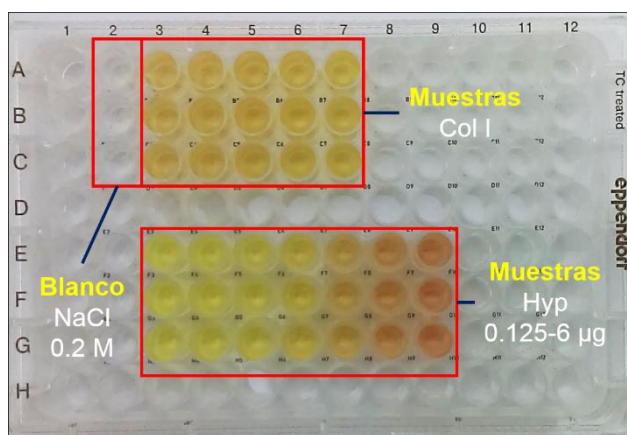


Figura 12. Montaje de las muestras en la microplaca para su medición en el lector de placas.

La secuencia de aminoácidos de las cadenas α de la colágena está compuesta por unidades repetitivas de tres aminoácidos, Gly-X-Y, donde la posición X está ocupada por prolina (Pro) y la Y por hidroxiprolina (Hyp). Debido a que la hidroxiprolina se repite n veces a lo largo de las cadenas, se hace uso de un factor de conversión con valor de 7.46 para determinar la concentración de la colágena (Ecuación 1) (Colgrave *et al.*, 2008).

$$Col = \frac{W_{Hyp} \cdot 7.46 \cdot 1 \times 10^6}{W_{Col} \cdot V_{Col}} \quad (1)$$

donde; **Col** es la concentración de la colágena tipo I (%); **W_{Hyp}** es la masa de la hidroxiprolina determinada a partir de la recta de calibración (μg) (Sección 5.1.1.); **7.46** es el factor de conversión que indica que por cada μg que hay de hidroxiprolina, se encuentran 7.46 μg de colágena; **1×10^6** es el factor de dilución; **W_{Col}** es la masa de la colágena líquida que se colocó en la ampolleta (μg) y; **V_{Col}** es el volumen de la muestra que se colocó en la microplaca para su medición en el lector de placas (μL).

4.2.4. Electroforesis

La pureza de la colágena tipo I se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en base a una modificación al método de Laemmli (Robyt y White, 1987). Las muestras se mezclaron con un buffer de muestra en una relación 1:1, se colocaron en un baño de agua en ebullición por 10 min y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente. Después se preparó el gel de poliacrilamida en un sistema de buffer discontinuo (Apéndice 8.1.2.), se colocó el gel en la cámara de electroforesis, se vertió el buffer de Tris/Glicina/SDS en la cámara y se cargaron $\sim 10 \mu\text{g}$ de la proteína en los carriles del gel (Figura 13). La corrida se realizó haciendo circular una corriente de 30 mA por 2 h empleando una fuente de corriente continua. Luego se retiró el gel de la cámara y se tiñó con una disolución de azul de Coomassie 0.05 % (p/v)/HAc 10 %/MeOH 50 %/ $\text{H}_2\text{O}_{\text{di}}$ 40 % por 12 h y se destiñó con una disolución de HAc 10 %/MeOH 50 %/ $\text{H}_2\text{O}_{\text{di}}$ 40 %. Las imágenes de los geles se obtuvieron empleando un sistema de documentación de geles utilizando el programa computacional *Quantity-One*[®] 1-D.



Figura 13. Equipo de electroforesis empleado para conocer la pureza de la colágena tipo I. Fuente de corriente continua (izquierda) y cámara de electroforesis (derecha).

4.3. Extracción y Caracterización del Quitosán

4.3.1. Extracción

La extracción de la quitina a partir de exoesqueletos de camarón y su conversión a quitosán se realizó de acuerdo con el método de Miranda, 2000 (Figura 14).

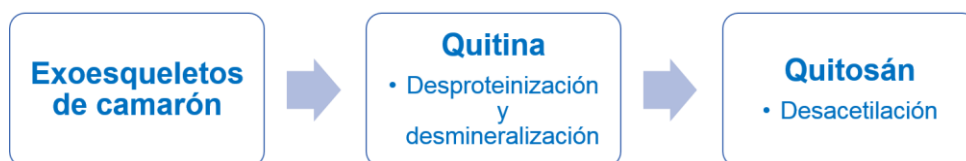


Figura 14. Cuadro metodológico del proceso de extracción de la quitina a partir de exoesqueletos de camarón y su conversión a quitosán.

Debido a las diferencias propias de la especie de donde proviene el material quitinoso, así como a las diferencias en los procesos de extracción y conversión, se obtiene como resultado un producto con diferentes cualidades físicas, químicas y biológicas. Por esta razón, el quitosán se caracterizó física y químicamente centrándonos fundamentalmente en la determinación del grado de desacetilación y peso molecular promedio (Hidalgo y Miranda, 2013).

4.3.2. Grado de Desacetilación

El grado de desacetilación del quitosán se determinó por titulación potenciométrica realizando tres réplicas del experimento (De Alvarenga, 2011; Hidalgo y Miranda, 2013). El biopolímero se secó a 105 °C en una estufa hasta alcanzar una masa constante. Una vez libre de humedad, se disolvieron 0.3 g de éste en 45 mL de HCl 0.2 M bajo agitación constante por 24 h y se filtró la disolución. La disolución de quitosán se valoró con NaOH 0.1 M empleando un pHmetro. El agua utilizada en la preparación de las disoluciones fue desionizada. La titulación se llevó a cabo midiendo el cambio de pH por cada mililitro de base añadido hasta llegar a pH~12, la adición se realizó de forma lenta bajo agitación constante para homogeneizar la disolución y evitar errores debido a la posible precipitación del biopolímero (Figura 15) (Hidalgo *et al.*, 2008). De esta manera, se obtiene una curva de la variación del pH frente al volumen añadido de la base (Figura 25a), la cual presenta dos puntos de inflexión: el primero corresponde a la neutralización del HCl y el segundo a la neutralización de los iones amonio del quitosán (De Alvarenga, 2011). Por lo tanto, la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos amino del biopolímero corresponde a la diferencia entre estos puntos y dicho valor es de gran utilidad para conocer el grado de desacetilación del quitosán, el cual se determinó empleando la ecuación 2. Los puntos de inflexión de la curva potenciométrica de la disolución biopolimérica se determinó de acuerdo con el criterio de la primera derivada con el fin de encontrar los máximos en la curva utilizando el programa computacional *OriginPro 8* (Figura 25b).

$$GD = \frac{z(y-x)161}{w} \quad (2)$$

donde, **GD** es el grado de desacetilación del quitosán (%), **z** es la concentración del NaOH (M), **y** es el punto de inflexión mayor (mL), **x** es el punto de inflexión menor (mL), **161** es la masa molar del monómero (C₆H₁₁O₄N) y **w** es la masa del biopolímero (mg).



Figura 15. Montaje de la titulación potenciométrica para determinar el grado de desacetilación del quitosán.

4.3.3. Peso Molecular Promedio

El peso molecular promedio del quitosán se determinó por viscosimetría capilar (Kasaai, 2007; Hidalgo y Miranda, 2013). El biopolímero se secó a 105 °C en una estufa hasta alcanzar una masa constante. Una vez libre de humedad, se disolvieron 0.2 g de éste en 100 mL de una disolución buffer de HAc 0.3 M/NaAc 0.2 M con pH~4.6 bajo agitación constante por 24 h y se filtró la disolución. A partir de esta disolución de quitosán (0.2 g·dL⁻¹), se prepararon diluciones de 0.1, 0.05 y 0.025 g·dL⁻¹. El agua utilizada en la preparación de la disolución buffer fue desionizada. Las viscosidades de las disoluciones se midieron empleando un viscosímetro capilar tipo Ostwald sumergido en un baño de agua a (25 ± 1) °C bajo agitación constante. Una vez establecidas las condiciones de trabajo, se midió el tiempo de caída entre las dos marcas del viscosímetro de la disolución buffer y de las disoluciones biopoliméricas, efectuándose cinco mediciones del tiempo para cada disolución (Figura 16). Con los valores obtenidos, se calculó la viscosidad relativa, específica y reducida de las disoluciones de quitosán (Ecuaciones 3, 4 y 5, respectivamente). La viscosidad reducida y la concentración de las disoluciones biopoliméricas se graficaron para determinar la ecuación de la recta y obtener la viscosidad intrínseca, siendo esta última la ordenada al origen. El peso molecular promedio del quitosán se determinó de acuerdo con la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (MHS) (Ecuación 6), la cual relaciona la viscosidad intrínseca de una disolución polimérica con el peso molecular del polímero.

$$\eta_{rel} = \frac{t}{t_0} \quad (3)$$

donde, η_{rel} es la viscosidad relativa, t_0 es el tiempo de caída del buffer (s) y t es el tiempo de caída de la disolución de quitosán (s).

$$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1 \quad (4)$$

donde, η_{esp} es la viscosidad específica.

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{esp}}{C} \quad (5)$$

donde, η_{red} es la viscosidad reducida ($\text{dL}\cdot\text{g}^{-1}$) y C es la concentración de la disolución de quitosán ($\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$).

$$[\eta] = KM_w^a \quad (6)$$

donde; $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca; M_w es el peso molecular promedio (Da); y K y a son constantes que dependen para un sistema soluto-solvente dado, a una temperatura determinada. Los valores reportados de las constantes K y a para el quitosán en el buffer utilizado (HAc 0.3 M/NaAc 0.2 M, pH~4.6) a 25 °C son $76 \times 10^{-5} \text{ dL}\cdot\text{g}^{-1}$ y 0.76 respectivamente (Kasaai, 2007).



Figura 16. Montaje de la viscosimetría capilar para determinar el peso molecular promedio del quitosán.

4.4. Elaboración de Membranas de Colágena-Quitosán

Las membranas de colágena-quitosán se elaboraron en forma de película de acuerdo con la técnica de evaporación del disolvente. Las disoluciones de colágena tipo I (Col I) y quitosán (CS) se prepararon por separado a una concentración de 0.5 % (p/v) en HAc 1 % (v/v). Después estas disoluciones se mezclaron a diferentes proporciones, se depositaron en moldes y se dejaron secar a 25 °C (Tabla 2). Luego las membranas se entrecruzaron químicamente sumergiéndolas en EDC bajo agitación constante por 21 h con el fin de mejorar sus propiedades fisicoquímicas. Por último, las membranas se enjuagaron varias veces con agua desionizada para retirar los residuos del entrecruzante, se secaron una vez más a 25 °C y se almacenaron en un desecador hasta su uso.

Tabla 2. Proporciones elegidas de colágena tipo I (Col I) y quitosán (CS) para la elaboración de las membranas.

Nomenclatura	Col I 0.5 % (%)	CS 0.5 % (%)
C0	0	100
C25	25	75
C50	50	50
C75	75	25
C100	100	0

4.5. Caracterización Fisicoquímica de las Membranas de Colágena-Quitosán

4.5.1. Espectroscopía de Infrarrojo

Las membranas de colágena-quitosán se analizaron por espectroscopía de infrarrojo para identificar los grupos químicos presentes en los polímeros, determinar la interacción entre los componentes de la mezcla (Col I y CS) y confirmar el entrecruzamiento químico debido al EDC. Para el análisis se empleó un espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) equipado con un sistema de muestreo por reflectancia total atenuada (ATR, por sus siglas en inglés) con punta de diamante. El estudio se realizó en un intervalo de longitud de onda de 4000-400 cm^{-1} a

una resolución de 4 cm⁻¹, llevándose a cabo 32 barridos. Los espectros obtenidos se normalizaron y se identificaron las bandas de absorción utilizando el programa computacional *Opus 7.8*.

4.5.2. Absorción de PBS

Los hidrogeles se definen como materiales compuestos por un sólido (en este caso membranas poliméricas) y un líquido (agua o fluidos biológicos), de tal manera que sus propiedades fisicoquímicas y biológicas estarán definidas por la cantidad de líquido que sean capaces de retener en sus redes poliméricas. La absorción de líquido por los hidrogeles puede depender de diversos factores, como: la naturaleza de la disolución en la que se encuentren inmersos, la estructura de la red polimérica, la presencia o ausencia de poros, la densidad de entrecruzamiento, entre otros (Omidian y Park, 2010).

La capacidad de absorción de líquido por las membranas de colágena-quitosán se determinó por gravimetría. A las membranas secas se les midió la masa empleando una balanza analítica, después se sumergieron en PBS y se incubaron a 37 °C por 24 h, con el fin de simular un fluido biológico. Por último, se les midió la masa una vez más, removiendo el exceso de agua sobre la superficie de las membranas con papel filtro. De esta manera, únicamente se considera el agua en el volumen interior de la membrana. El porcentaje de absorción de PBS por las membranas se calculó empleando la ecuación 7. El experimento se realizó por triplicado.

$$Q = \frac{W_f - W_0}{W_0} \cdot 100 \quad (7)$$

donde, Q es el porcentaje de absorción de PBS por la membrana (%), W_0 es la masa de la membrana seca (g) y W_f es la masa de la membrana hidratada con PBS (g).

4.5.3. Análisis Térmico

La estabilidad térmica de las membranas de colágena-quitosán se evaluó por análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido (TGA y DSC, por sus siglas en inglés). El estudio de TGA y DSC se llevó a cabo empleando una termobalanza y un calorímetro en un intervalo de temperatura de 35-200 y 0-200 °C, respectivamente. Ambos análisis se realizaron con una rampa de calentamiento de 5 °C/min en una atmósfera de nitrógeno. Los termogramas obtenidos se normalizaron y se determinó el

porcentaje de pérdida de peso, la temperatura y entalpía de deshidratación utilizando el programa computacional *OriginPro 8*.

4.5.4. Ensayo Mecánico

El comportamiento mecánico de las membranas de colágena-quitosán se evaluó mediante un ensayo de tensión uniaxial realizando tres réplicas del experimento. Las membranas se hidrataron con PBS a 37 °C por 24 h, después se cortaron con un suaje de acuerdo con la norma ASTM-D1708-96 (Figura 17) y se midió su espesor en tres diferentes puntos empleando un micrómetro. La respuesta mecánica de las probetas hidratadas se evaluó empleando un texturómetro con una celda de carga de 25 kg (Figura 18). Las pruebas se realizaron a una velocidad de deformación de 10 mm/min y a una temperatura de 25 °C. A partir de los datos (fuerza y desplazamiento) adquiridos por el programa computacional *TexturePro CT* y las dimensiones de las probetas, se graficaron curvas de esfuerzo-deformación a través de las cuales, se determinaron algunos parámetros mecánicos como el esfuerzo último a la tensión (UTS) y el módulo elástico o módulo de Young (E).

El esfuerzo y la deformación se calcularon empleando las ecuaciones 8 y 9, respectivamente. Por otro lado, el módulo elástico se calculó en la región lineal de las curvas esfuerzo-deformación mediante una regresión lineal siendo la pendiente de la curva el módulo de Young.

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (8)$$

donde, σ es el esfuerzo aplicado por el área transversal de la probeta (Pa), F es la fuerza de tensión que se le aplica a la probeta para deformarla (N) y A es el área transversal de la probeta, es decir, el área que se ubica de forma perpendicular a la dirección de deformación o de aplicación de la fuerza (m²).

$$\varepsilon = \frac{l - l_0}{l_0} \cdot 100 \quad (9)$$

donde, ε es la deformación longitudinal de la probeta (%), l_0 es la distancia inicial de la zona calibrada de la probeta de tensión uniaxial (m) y l es el cambio en la distancia a distintos niveles de carga (m).

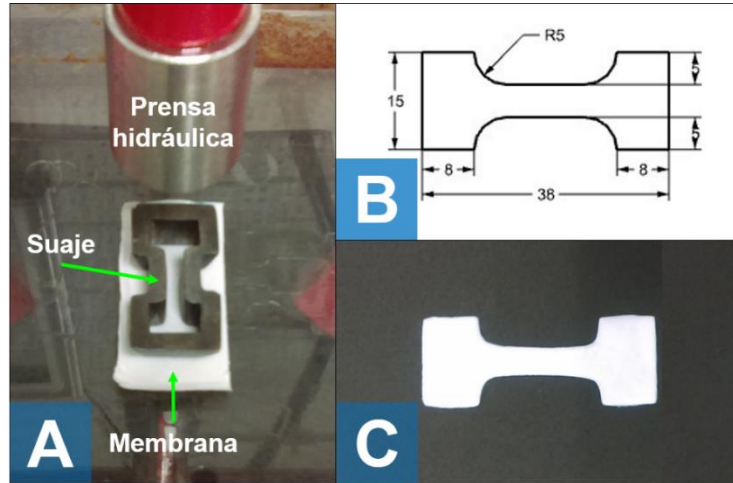


Figura 17. A) Corte de las membranas empleando un suaje y una prensa hidráulica, b) dimensiones de las probetas (en milímetros) de acuerdo con la norma ASTM-D1708-96 y c) probeta (membrana C100) hidratada con PBS.



Figura 18. Texturómetro empleado para los ensayos de tensión uniaxial y algunos de sus componentes para el montaje de la probeta (membrana C100) hidratada con PBS.

4.5.5. Degradación *in vitro*

La degradabilidad de las membranas de colágena-quitósán se evaluó mediante una digestión enzimática. A las membranas secas se les midió la masa empleando una balanza analítica (W_0), después se sumergieron en lizozima/PBS 112 000 U/mL y se incubaron a 37 °C a diferentes tiempos de contacto (0, 3, 6, 12, 24, 72, 120, 168, 336 h). La disolución de lizozima se cambió cada 24 h con el fin de no saturar la disolución y mantener la actividad enzimática. Al término de cada tiempo de contacto, las membranas se retiraron de la disolución enzimática, se enjuagaron con agua desionizada y se secaron a 60 °C por 12 h. Por último, se les midió la masa una vez más (W_f) para calcular el porcentaje de pérdida de masa (Q) empleando la ecuación 7. El experimento se realizó por triplicado.

4.5.6. Morfología

La morfología de las membranas de colágena-quitósán se estudió por microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés). Las membranas se lavaron con PBS, se deshidrataron en concentraciones crecientes de EtOH y se secaron a punto crítico (CPD, por sus siglas en inglés) de CO₂ con el fin de mantener la microestructura inicial del estado hidratado. Después se montaron en porta muestras de aluminio sobre cinta de carbón adhesiva, se recubrieron con una capa delgada de oro por deposición física en fase vapor asistida por plasma (PAPVD, por sus siglas en inglés) y se observó su superficie y canto empleando un microscopio electrónico de barrido en modo de electrones secundarios con un voltaje de aceleración de 10 kV a un alto vacío.

4.6. Caracterización Biológica de las Membranas de Colágena-Quitósán

4.6.1. Cultivo Celular

Una línea celular de osteoblastos fetales humanos (hFOB) fue utilizada para evaluar la adhesión, viabilidad y morfología celular al ser cultivada sobre las membranas de colágena-quitósán. Las células hFOB se cultivaron y se expandieron en medio de cultivo DMEM suplementado con FBS 10 %, una disolución de antibióticos (penicilina 100 UI/mL, estreptomycin 100 µg/mL y fungizona 0.3 µg/mL) y L-glutamina 2 mM. Los cultivos celulares se mantuvieron a una temperatura de 37 °C, en una atmósfera de aire-CO₂ 95-5

% y con una humedad del 100 %. Para los ensayos se utilizaron cultivos en el 2^{do} y 6^{to} pasaje.

4.6.2. Adhesión Celular

La adhesión de las células hFOB con las membranas de colágena-quitósán se evaluó de acuerdo con el método de cristal violeta realizando tres réplicas del experimento. Los osteoblastos se sembraron sobre las membranas a una densidad celular de 1×10^4 células/mL y se cultivaron por 4 h. Transcurrido el tiempo de cultivo, las membranas se lavaron con PBS para remover las células no adheridas. Las membranas con las células adheridas se fijaron con PFA 4 % por 24 h, se lavaron una vez más con PBS, se incubaron con cristal violeta 0.1 % por 15 min y se lavaron con agua bidestilada para remover el exceso del colorante. El cristal violeta fijado en las membranas con las células se extrajo con 200 μ L de SDS 2 % y se midió su absorbancia a una longitud de onda de 545 nm empleando un lector de placas de ELISA. Los cultivos controles fueron las células sembradas sobre la microplaca de cultivo. Los valores obtenidos de absorbancia se convirtieron a porcentajes de células adheridas considerando la microplaca de cultivo como el 100 % de la adhesión celular.

4.6.3. Viabilidad Celular

La viabilidad de las células hFOB con las membranas de colágena-quitósán se evaluó utilizando el kit de conteo celular-8 (CCK-8). El ensayo se basa en la habilidad de la enzima deshidrogenasa para reducir la sal de tetrazolio 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfonil)-2H-tetrazolio (WST-8) a un producto de color naranja soluble en el medio de cultivo (WST-8 Formazán) (Figura 19). La cantidad de formazán producido por las deshidrogenasas en las células es directamente proporcional al número de células vivas.

Los osteoblastos se sembraron sobre las membranas de colágena-quitósán a una densidad celular de 1×10^4 células/mL y se cultivaron por 1, 3, 5, 7 y 14 días. Al término de cada periodo de cultivo, las células se incubaron con 10 μ L de la disolución del CCK-8 por 4 h. Transcurrido este tiempo, se retiraron 200 μ L del medio de cultivo, se colocaron en una microplaca de 96 pozos y se midió la densidad óptica (D.O.) a una longitud de onda de 450 nm empleando un lector de placas de ELISA. El experimento se realizó por triplicado.

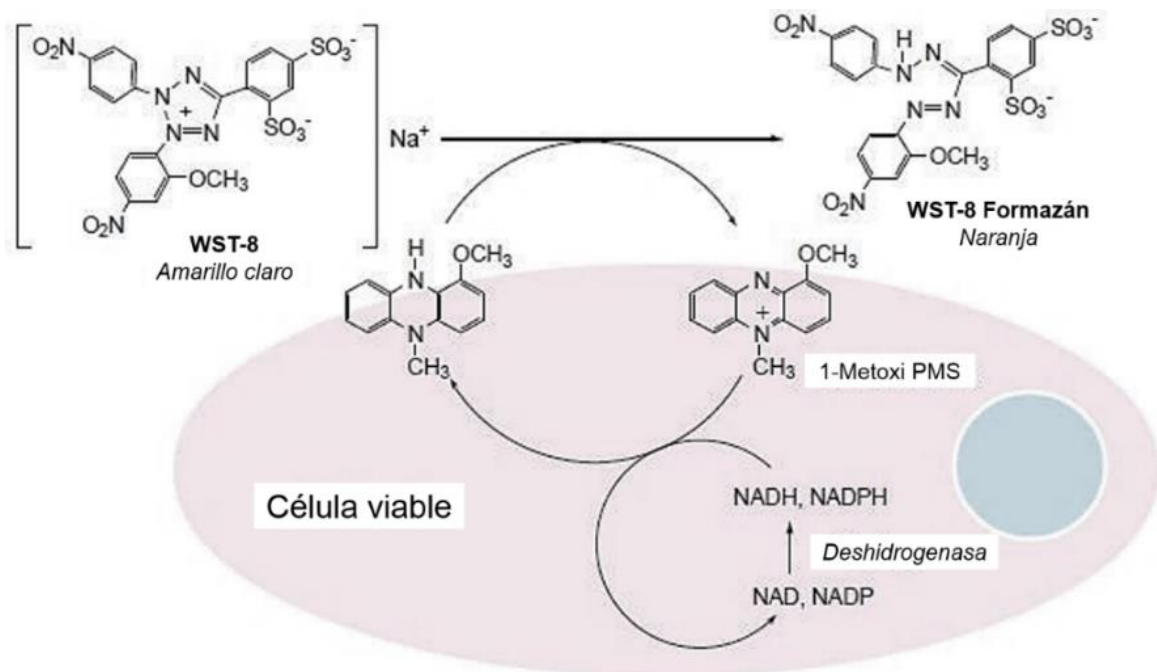


Figura 19. Mecanismo de detección de la viabilidad celular con CCK-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., 2017).

4.6.4. Morfología Celular

La interacción morfológica de las células hFOB sobre las membranas de colágeno-citosán se estudió por microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés). Los osteoblastos se sembraron sobre las membranas a una densidad celular de 1×10^4 células/mL y se cultivaron por 24 h. Transcurrido el tiempo de cultivo, las membranas se lavaron con PBS para remover las células no adheridas. Las membranas con las células adheridas se fijaron con PFA 4 % y OsO₄ 1 % por 12 y 2 h, respectivamente; y se lavaron una vez más con PBS al término de cada periodo de fijación. Después las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de EtOH y se secaron a punto crítico (CPD, por sus siglas en inglés) de CO₂. Luego éstas se montaron en porta muestras de aluminio sobre cinta de carbón adhesiva, se recubrieron con una capa delgada de oro por deposición física en fase vapor asistida por plasma (PAPVD, por sus siglas en inglés) y se observó la morfología celular empleando un microscopio electrónico de barrido en modo de electrones secundarios con un voltaje de aceleración de 10 kV a un alto vacío.

4.7. Análisis Estadístico

Las comparaciones estadísticas de las Figuras 29, 33, 34, 36 y 46, se llevaron a cabo mediante un análisis de varianzas (ANOVA, por sus siglas en inglés) de una y dos vías seguido de las pruebas *post hoc* de Dunnet y Sidak utilizando el programa computacional *GraphPad Prism 6.01*. Los valores de las medias con diferencias estadísticas de $p < 0.05$ y $p < 0.01$ se consideraron significativos y muy significativos, respectivamente.

5. Resultados y Discusión

5.1. Caracterización de la Colágena Tipo I

5.1.1. Cuantificación

La concentración de colágena tipo I (Col I) se determinó a partir de la cuantificación de la hidroxiprolina (Hyp). Los valores de absorbancia de las muestras de Col I se interpolaron en la recta de calibración de la Figura 20 para determinar la cantidad de Hyp presente en las muestras y por ende calcular la concentración de Col I utilizando la ecuación 1 (Sección 4.2.3.). En la Tabla 3 se muestran los valores obtenidos de absorbancia, cantidad de Hyp y concentración de Col I. La concentración de Col I que se utilizó para la elaboración de las membranas fue del 0.5 % (p/v).

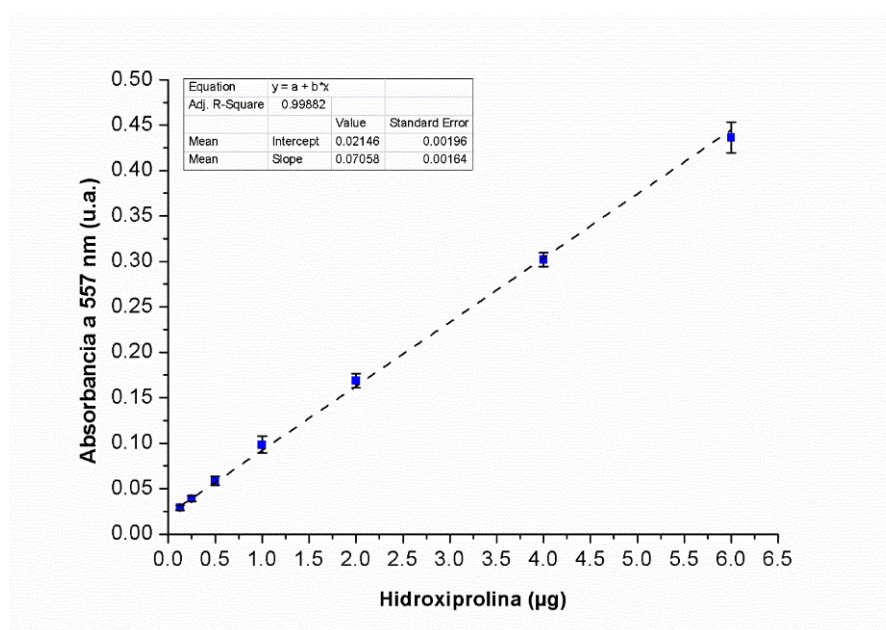


Figura 20. Recta de calibración de hidroxiprolina. La cuantificación de hidroxiprolina permite estimar la concentración de la colágena tipo I. Las desviaciones estándares son directamente proporcionales a las incertidumbres de las constantes de la recta.

Tabla 3. Concentración de la colágena tipo I (media \pm desviación estándar, n=5).

Absorbancia (u.a.)	0.31 \pm 0.02
Hidroxiprolina (μg)	4.05 \pm 0.32
Colágena tipo I (%)	0.95 \pm 0.04

El rendimiento que se obtuvo con el método propuesto para la extracción y purificación de Col I fue del 54.6 %, siendo un porcentaje mayor al reportado por Nalinanon *et al.*, 2007 que es del 41 %. Estos rendimientos se deben principalmente a que durante los procesos se desprenden las secuencias de aminoácidos terminales de las proteínas (telopéptidos), se separan las proteínas de otros componentes no proteicos y se aísla selectivamente la Col I de otros tipos de proteína. La disolución de Col I obtenida presentó una apariencia de color blanco y viscosa, propiedades físicas típicas de las proteínas colagénicas (Figura 21).



Figura 21. Disolución de la colágena tipo I obtenida a partir del tendón de bovino.

5.1.2. Electroforesis

La pureza de la colágena tipo I (Col I) se analizó por electroforesis. Esta técnica permite evidenciar las cadenas que conforman a una proteína. De acuerdo con Miller y Rhodes, 1982, el patrón electroforético que caracteriza a Col I presenta dos cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$, que a su vez están ligadas íntimamente con los dímeros β y trímeros γ . En el patrón electroforético de la Figura 22, se observó que las muestras analizadas presentaron como principales constituyentes las cadenas $\alpha 1$ (140.8 kDa), $\alpha 2$ (127.6 kDa), β (240.1 y 256.4 kDa) y γ (322.7 y 337.2 kDa), a partir de lo cual se asume que la colágena obtenida tiene la estructura típica de Col I.

Los entrecruzamientos entre las moléculas de Col I se concentran en la región telopéptida impidiendo una completa solubilidad de la proteína. Una incisión de esta zona mediante el uso de pepsina facilita la solubilidad de Col I sin alterar la integridad de la molécula. En el patrón electroforético, este desprendimiento de la región telopéptida se reflejó con una mayor intensidad de las bandas α y β debido a la disminución del peso molecular de las cadenas (Carriles 2 y 3).

La calidad de Col I mejora con el proceso de purificación debido a que se pierde material no colagenoso e inclusive colágena de un tipo diferente a la I. En el patrón electroforético, este fenómeno se exhibió con la ausencia de bandas entre las cadenas α - β y β - γ (Carriles 3 y 5). Asimismo, la colágena obtenida (Carril 5) se comparó con un estándar de Col I (Carril 6) con el fin de evaluar su calidad, observándose que la obtenida presentó una alta pureza similar a la del estándar debido a que las bandas características de Col I están presentes y no existen otras aparte de éstas.

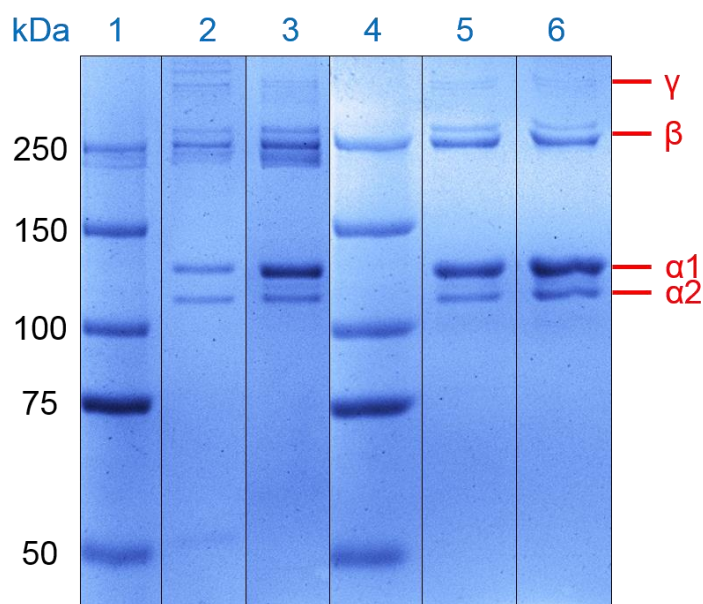


Figura 22. Patrón electroforético de la colágena tipo I (Col I) en las diferentes etapas del proceso de extracción y purificación. Carril 1 y 4: marcador de pesos moleculares; carril 2: Col I antes de la digestión enzimática; carril 3: Col I después de la digestión enzimática; carril 5: Col I después del proceso de purificación; y carril 6: estándar de Col I.

5.2. Caracterización del Quitosán

En el caso del método empleado para la extracción de quitina (CN) y su conversión a quitosán (CS) se obtuvo un rendimiento del 24.8 %, el cual se debe esencialmente a que durante los procesos se separan las proteínas rompiendo la estructura de la matriz quitinosa mediante una hidrólisis alcalina, se retiran los minerales (básicamente calcio) convirtiendo a los carbonatos en cloruros a través de una hidrólisis ácida y se remueven los grupos acetilo de la molécula de CN por medio de una hidrólisis termoalcalina (Mármol *et al.*, 2011). En la Figura 23 se muestra CN y CS, productos obtenidos a partir de los exoesqueletos de camarón. La concentración de CS que se utilizó para la elaboración de

las membranas fue la misma que la de la Col I (0.5 % p/v). La disolución de CS obtenida presentó una apariencia de color ligeramente amarillo, transparente y viscosa (Figura 24).



Figura 23. a) Exoesqueletos de camarón, b) quitina y c) quitosán.



Figura 24. Disolución de quitosán obtenida a partir de los exoesqueletos de camarón.

5.2.1. Grado de Desacetilación

El grado de desacetilación del quitosán (CS) se determinó por titulación potenciométrica. En la Figura 25a se muestra la variación del pH de la disolución de CS con respecto al volumen adicionado de la base. Los valores de los puntos de inflexión de la curva potenciométrica se determinaron de acuerdo con el criterio de la primera derivada (Figura 25b) para después calcular el grado de desacetilación de CS utilizando la ecuación 2 (Sección 4.3.2.). El CS obtenido presentó un alto grado de desacetilación del $(96.47 \pm 0.16) \%$, lo que hace que sea altamente soluble en ácidos diluidos. Por lo general, los quitosanos comerciales tienen un grado de desacetilación mínimo del 60 % (Hernández *et al.*, 2009; De la Paz *et al.*, 2012).

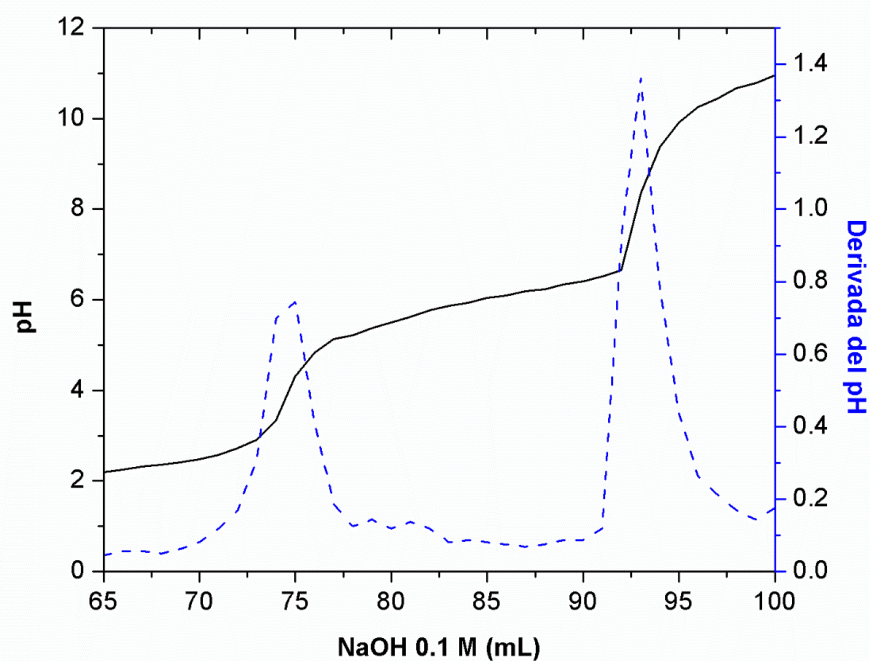


Figura 25. a) Curva potenciométrica (línea continua) y b) primera derivada de la curva potenciométrica (línea punteada) de la disolución de quitosán.

5.2.2. Peso Molecular Promedio

El peso molecular promedio del quitosán (CS) se determinó por viscosimetría capilar. En la Figura 26 se muestra la viscosidad reducida frente a la concentración de la disolución de CS. A partir de la ecuación de la recta, se determinó la viscosidad intrínseca (ordenada al origen) para después calcular el peso molecular de CS utilizando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (Ecuación 6, Sección 4.3.3.). El CS obtenido presentó un peso molecular promedio de (145.18 ± 1.98) kDa, el cual se encontró dentro del intervalo reportado de pesos moleculares (100-600 kDa) de acuerdo con las condiciones experimentales en las que se trabajó (Kasaai, 2007).

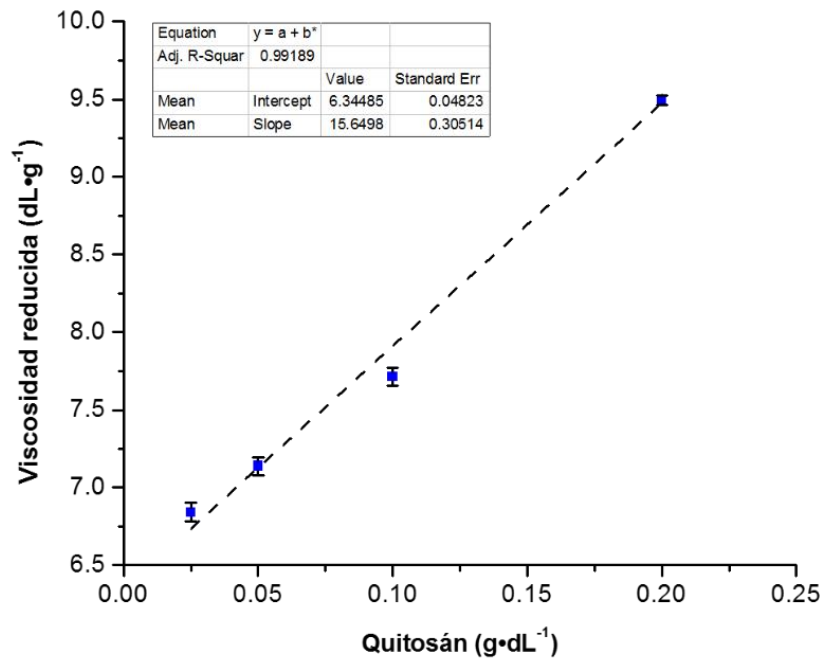


Figura 26. Viscosidad reducida frente a la concentración de la disolución de quitosán. Las desviaciones estándares son directamente proporcionales a las incertidumbres absolutas de las constantes de la recta.

5.3. Membranas de Colágena-Quitosán

Las membranas de colágena-quitosán se elaboraron en forma de película de acuerdo con la técnica de evaporación del disolvente. Cabe mencionar, que en la elaboración de éstas se determinaron experimentalmente los siguientes puntos: 1) la concentración de la disolución de colágena tipo I (Col I) y quitosán (CS), 2) el volumen necesario de las diferentes disoluciones a depositar para conseguir un cierto espesor, 3) el material conveniente para depositar las disoluciones, 4) las condiciones apropiadas de secado de las disoluciones para lograr un espesor homogéneo de las membranas y, por último, 5) la forma de impermeabilizar las membranas para evitar su disolución. Una vez que se encontraron las condiciones idóneas para la elaboración de las membranas, éstas se entrecruzaron químicamente con EDC para mejorar sus propiedades fisicoquímicas.

Las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento se muestran en la Figura 27. En esta figura se puede observar que el color de las membranas se relaciona con su composición química, es decir, las membranas son más blancas o amarillas según tengan una mayor proporción de Col I o CS. Además, se puede ver que las membranas entrecruzadas son más opacas que las no entrecruzadas, esto se puede deber a que el EDC afecte algunos parámetros estructurales de las redes poliméricas (tamaño de poro de la red polimérica¹, densidad de entrecruzamiento², peso molecular entre puntos de entrecruzamiento³, entre otros.) impidiendo que la luz visible pase a través de éstas. Por otro lado, es importante mencionar que las membranas obtenidas se compararon con una membrana comercial (Membracel[®]-O), la cual es de colágena nativa de bovino y está en forma de película.

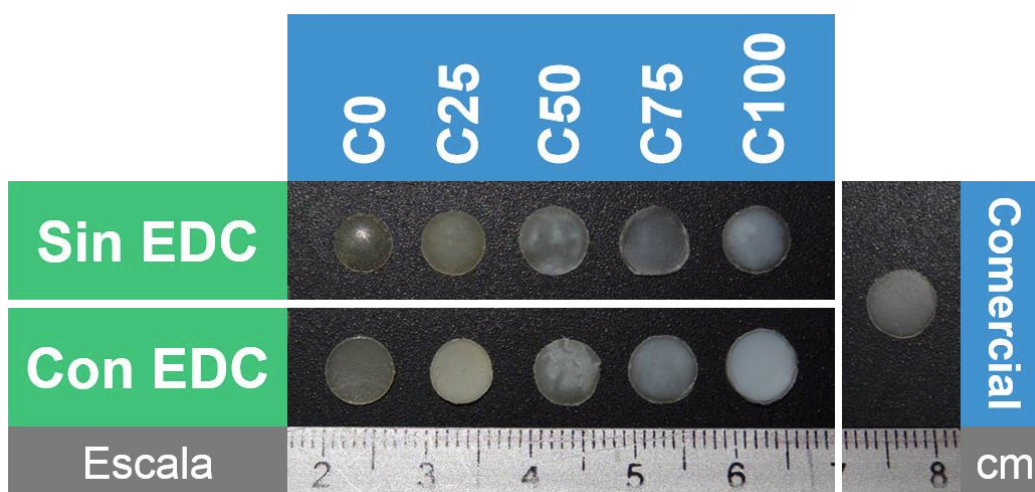


Figura 27. Membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento; y una membrana comercial (Membracel[®]-O) como control.

¹ Tamaño de poro de la red polimérica: distancia promedio entre puntos de entrecruzamiento (D'Errico *et al.*, 2008).

² Densidad de entrecruzamiento: número de cadenas poliméricas presentes por unidad de volumen (Treloar, 2005).

³ Peso molecular entre puntos de entrecruzamiento: peso promedio de las cadenas poliméricas que conforman la red, entendiendo que una cadena es aquella sección de unidades monoméricas comprendidas entre dos puntos de entrecruzamiento (Mathews *et al.*, 2008).

5.4. Caracterización Físicoquímica de las Membranas de Colágena-Quitósán

5.4.1. Espectroscopía de Infrarrojo

Los espectros de infrarrojo de las diferentes membranas sin entrecruzamiento se muestran en la Figura 28a. En el espectro de la membrana de colágena (C100) se pueden observar cinco bandas de absorción características. La banda de amida I (1630 cm^{-1}) se origina a partir de las vibraciones de estiramiento C=O acopladas a vibraciones de flexión N-H. La amida II (1546 cm^{-1}) surge debido a las vibraciones de flexión N-H acopladas a vibraciones de estiramiento C-N. La amida III (1246 cm^{-1}) representa la combinación de picos entre las vibraciones de estiramiento C-N y flexión N-H. Las otras dos bandas surgen a partir de las vibraciones de estiramiento -OH (3445 cm^{-1}) y N-H (3300 cm^{-1}) (Ungureanu *et al.*, 2015). Asimismo, se puede ver que las bandas de la membrana comercial se encuentran aproximadamente en las mismas regiones que las de la membrana C100 denotando que se trata de la misma sustancia.

Al igual que en el espectro de la membrana C100, en el de la membrana de quitósán (C0) se pueden apreciar las bandas de absorción características en cinco lugares. Entre $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ se muestra una señal ancha debida a la vibración de estiramiento de los grupos -OH (3452 cm^{-1}) y N-H (3311 cm^{-1}), en 1643 cm^{-1} aparece la vibración de estiramiento del grupo C=O de las unidades acetiladas, en 1580 cm^{-1} se evidencia la vibración de flexión del grupo -NH₂ y en 1150 cm^{-1} se ve la vibración de estiramiento del enlace glucosídico C-O-C entre las unidades monoméricas del quitósán (Suyatma *et al.*, 2011).

Los espectros de las membranas de colágena-quitósán (C25, C50 y C75) ilustran picos característicos similares a los de las moléculas de origen (C0 y C100). Por ejemplo, la intensidad del pico de amida I característico de la colágena (1630 cm^{-1}) disminuye gradualmente al aumentar la proporción de quitósán. Por otro lado, la intensidad del enlace glucosídico del quitósán (1150 cm^{-1}) decrece con la presencia de la colágena. Estos resultados sugieren la posible dominación de las interacciones físicas entre las moléculas de colágena y quitósán, y las interacciones químicas mínimas en las mezclas coincidiendo con Tangsadthakun *et al.*, 2006.

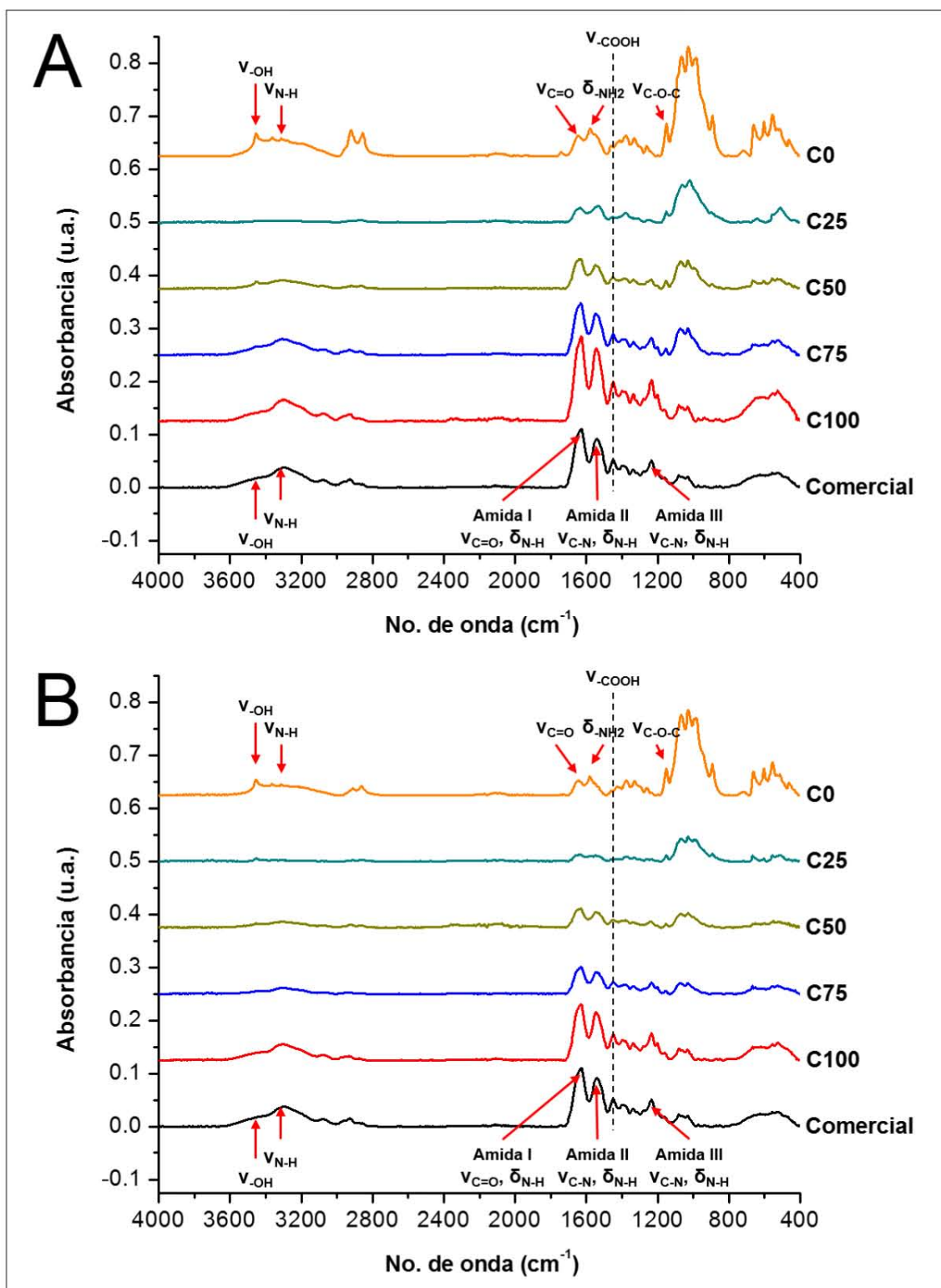


Figura 28. Espectros de infrarrojo de las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros a) sin y b) con entrecruzamiento; y de la membrana comercial.

Los espectros de infrarrojo de las membranas entrecruzadas (Figura 28b), indican que la molécula de colágena y quitosán no se ve afectada por el entrecruzamiento con EDC, ya que las bandas de absorción de las membranas entrecruzadas se presentan en frecuencias muy similares a las de las membranas sin entrecruzar. A pesar de no haber cambio en las bandas, la intensidad de éstas disminuye por el entrecruzamiento. El debilitamiento de las intensidades de las bandas, de acuerdo con Zhang *et al.*, 2011 se puede deber a que varios grupos hidroxilo, carboxilo y amino participan en la reacción de entrecruzamiento para formar enlaces covalentes de tipo amida (1630, 1546 y 1246 cm^{-1}). Estos resultados demuestran que el entrecruzamiento de las membranas se llevó a cabo exitosamente.

5.4.2. Absorción de PBS

Los hidrogeles generalmente presentan una alta capacidad de absorción de líquido, siendo ésta una característica favorable en la ingeniería de tejidos ya que pueden retener dentro de su estructura fluidos ricos en nutrientes (Shabafrooz *et al.*, 2013) y citocinas que facilitan la estimulación de las células involucradas en la reparación tisular (Maver *et al.*, 2015). Por esta razón, es de gran importancia conocer la capacidad de absorción de las membranas para poder predecir su posible comportamiento biológico, el cual se discutirá más adelante.

Los porcentajes de absorción de PBS por las diferentes membranas sin y con entrecruzamiento se muestran en la Figura 29. En esta gráfica se puede observar que la capacidad de absorción de las membranas aumenta con la presencia de la colágena, siendo la membrana de colágena (C100) la que presenta el mayor porcentaje de absorción. Las membranas entrecruzadas con EDC muestran una menor capacidad de absorción que las que no se entrecruzaron, sin embargo, la única membrana que presenta una diferencia significativa con respecto al tratamiento (sin y con entrecruzamiento) es la C100, de acuerdo con la prueba *post hoc* de Sidak. La disminución del porcentaje de absorción se puede atribuir a varias razones: 1) gran parte de los grupos hidrófilos presentes en la colágena y el quitosán (-OH y -NH₂) se consumen en la reacción de entrecruzamiento según el análisis de infrarrojo (Sección 5.4.1.) y, 2) el tamaño de poro de las redes poliméricas decrece por el entrecruzamiento impidiendo que las moléculas de agua sean absorbidas (Kabiri *et al.*, 2003). Igualmente, se puede ver que la capacidad de absorción de las membranas C50 sin entrecruzar y C75 entrecruzada son

muy similares a la de la membrana comercial al no existir una diferencia significativa entre ellas, de acuerdo con la prueba *post hoc* de Dunnet.

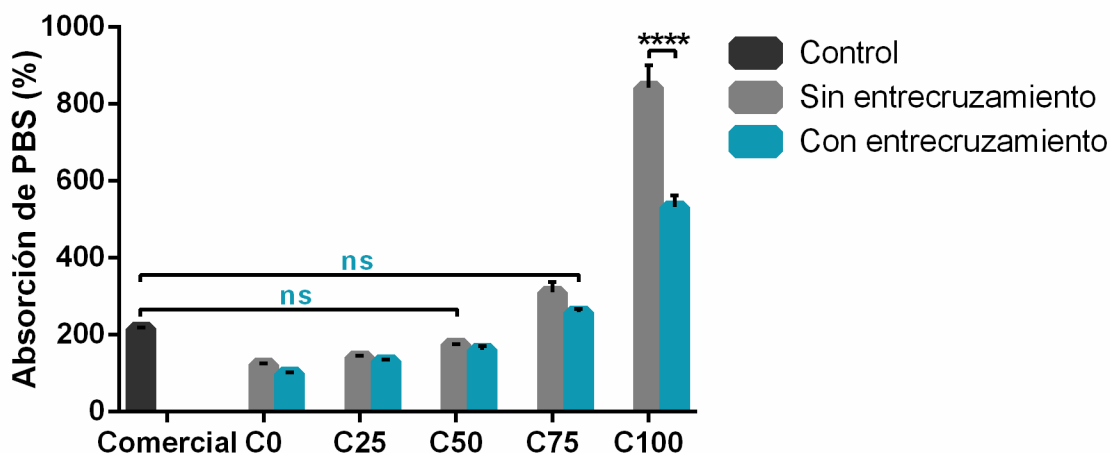


Figura 29. Porcentaje de absorción de PBS por las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento; y por la membrana comercial (**ns** indica que no existe diferencia significancia entre el control y las diferentes membranas elaboradas y; ******** denota que existe diferencia significativa entre las distintas membranas sin entrecruzar y entrecruzadas).

En la Tabla 4 se puede apreciar que el espesor de las diferentes membranas hidratadas con PBS se relaciona directamente con el porcentaje de absorción de éstas. El espesor aumenta con el incremento de la proporción de colágena y disminuye con el entrecruzamiento por las mismas razones que anteriormente se mencionaron. Asimismo, se puede ver que el espesor de la membrana comercial se encuentra dentro del intervalo de espesores de las membranas elaboradas.

Tabla 4. Espesor de las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento; y de la membrana comercial (media \pm desviación estándar, n=3).

Membrana	Espesor (μm)	
	Sin entrecruzamiento	Con entrecruzamiento
C0	192.0 \pm 1.7	173.3 \pm 16.3
C25	202.7 \pm 2.9	199.7 \pm 0.6
C50	223.3 \pm 6.1	216.7 \pm 1.5
C75	354.0 \pm 14.5	288.3 \pm 21.6
C100	724.3 \pm 13.6	643.4 \pm 24.9
Comercial	263.0 \pm 8.7	

5.4.3. Análisis Térmico

El conocimiento de la estabilidad térmica de un material es de primordial importancia debido a que esta propiedad está ligada a la estabilidad de los enlaces del material y a la cantidad de energía que será necesaria suministrar para romper estos enlaces. Así pues, un material con una estabilidad térmica alta es aquel que posee enlaces fuertes y que no será tan fácil de romper y/o degradar.

En los termogramas de DSC de las membranas sin entrecruzar (Figura 30a), se puede observar una transición de tipo endotérmico, en el intervalo de temperaturas entre los 25 y 175 °C, la cual se debe a la deshidratación por la pérdida de las uniones con las moléculas de agua (Jithendra *et al.*, 2013). En el caso de los termogramas de DSC de las membranas entrecruzadas con EDC (Figura 30b), éstos presentan un perfil térmico muy similar a los de las membranas que no se entrecruzaron, con la diferencia en que las membranas entrecruzadas exhiben un corrimiento en la temperatura hacia temperaturas más altas indicando que requieren de una mayor temperatura para deshidratarse. Cabe mencionar, que el proceso de deshidratación se confirmó con los termogramas de TGA (Figuras 30a y b), al tener que los porcentajes de pérdida de peso son bajos, encontrándose en un intervalo entre 8 y 13 %.

Los valores de temperatura y entalpía de deshidratación (T_d y ΔH_d , respectivamente) obtenidos a partir de los termogramas de DSC de las diferentes membranas sin y con entrecruzamiento se muestran en las Tablas 5 y 6. En estas tablas se puede apreciar que la T_d y ΔH_d de las membranas aumenta con la presencia de la colágena, no obstante, las membranas entrecruzadas con EDC presentan una mayor temperatura y entalpía de deshidratación que las que no se entrecruzaron. El incremento de la T_d y ΔH_d se puede atribuir a la formación de los nuevos enlaces covalentes por el entrecruzamiento que hace más estable a la estructura polimérica y, por lo tanto, la temperatura y entalpía que se requiere para romper las uniones con las moléculas de agua sea mayor. En el caso de la membrana comercial, se puede ver que la T_d y ΔH_d es mucho menor que la de algunas membranas elaboradas, indicando que la comercial se deshidrata a una temperatura y entalpía más baja que algunas que se elaboraron. Por otro lado, es importante mencionar que la T_d de la colágena es considerada como la temperatura a la cual comienza la desnaturalización de la proteína debido a la ruptura de los enlaces intercatenarios (Nam *et al.*, 2007).

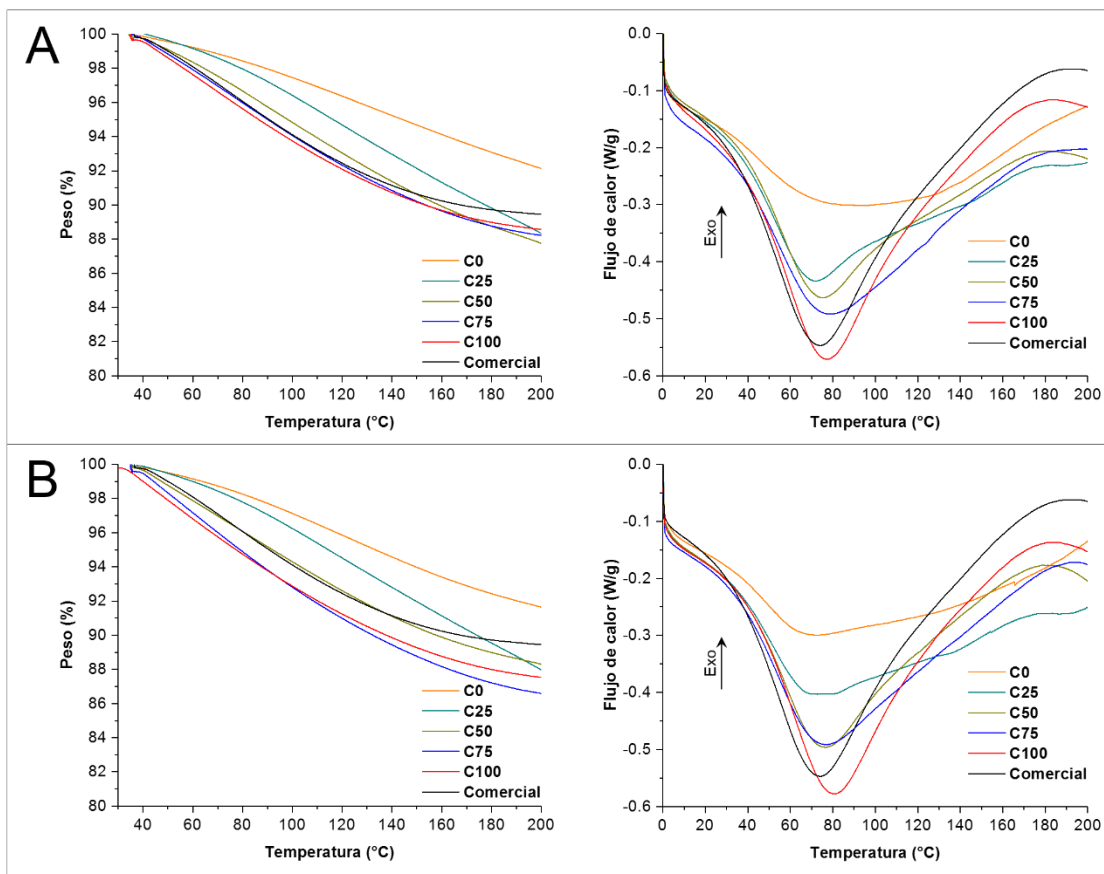


Figura 30. Termogramas de TGA y DSC de las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros a) sin y b) con entrecruzamiento; y de la membrana comercial. En el análisis de DSC, la masa inicial de las diferentes muestras fue la misma debido a que el flujo de calor es una propiedad extensiva.

Tabla 5. Temperatura de deshidratación de las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento; y de la membrana comercial.

Membrana	T_d (°C)	
	Sin entrecruzamiento	Con entrecruzamiento
C0	68.5	72.1
C25	71.9	72.7
C50	74.9	76.6
C75	76.9	79.4
C100	77.3	80.6
Comercial	74.1	

Tabla 6. Entalpía de deshidratación de las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento; y de la membrana comercial.

Membrana	ΔH_d (J/g)	
	Sin entrecruzamiento	Con entrecruzamiento
C0	158.2	173.4
C25	159.1	185.4
C50	215.2	229.8
C75	237.1	281.5
C100	278.6	288.1
Comercial	270.0	

Con el fin de conocer los procesos que se encuentran involucrados en la deshidratación de las membranas, se determinaron los cambios de pendiente de los termogramas de TGA y estos cambios se asociaron con los termogramas de DSC para llevar a cabo la deconvolución de la señal. A manera de ejemplo, en las Figuras 31a y b se muestran los termogramas de TGA y DSC de la membrana C75 sin y con entrecruzamiento, sin embargo, en el Apéndice 8.2.1. se pueden consultar los termogramas de las demás membranas. En estas figuras se puede observar que la deshidratación de las membranas entrecruzadas con EDC se lleva a cabo, en general, en un mayor número de procesos (representados como picos gaussianos en los termogramas de DSC) con un aumento en la T_d y ΔH_d asociada a éstos, indicando que estas membranas son más estables a la deshidratación que las membranas que no se entrecruzaron. Por otro lado, a partir de los termogramas de TGA, se determinaron los porcentajes de pérdida de peso de las membranas en dos zonas de los termogramas, la zona I que tiene que ver con agua fisisorbida (35-94 °C) y la zona II con agua quimisorbida (94-200 °C). Cabe mencionar, que la temperatura que se consideró como el límite entre la zona I y II fue de 94 °C debido a que este es el punto de ebullición del agua en la Ciudad de México. Con los porcentajes de pérdida de peso (Apéndice 8.2.2.), se determinaron los porcentajes de agua fisisorbida y quimisorbida por las diferentes membranas sin y con entrecruzamiento (Tabla 7). En esta tabla se puede apreciar que el porcentaje de agua quimisorbida aumenta conforme se incrementa la proporción de quitosán. No obstante, este parámetro disminuye en las membranas entrecruzadas con EDC. Lo anterior se puede atribuir a que los enlaces covalentes formados por el entrecruzamiento ocupen sitios de las cadenas poliméricas en donde también se pueden ligar las moléculas de agua.

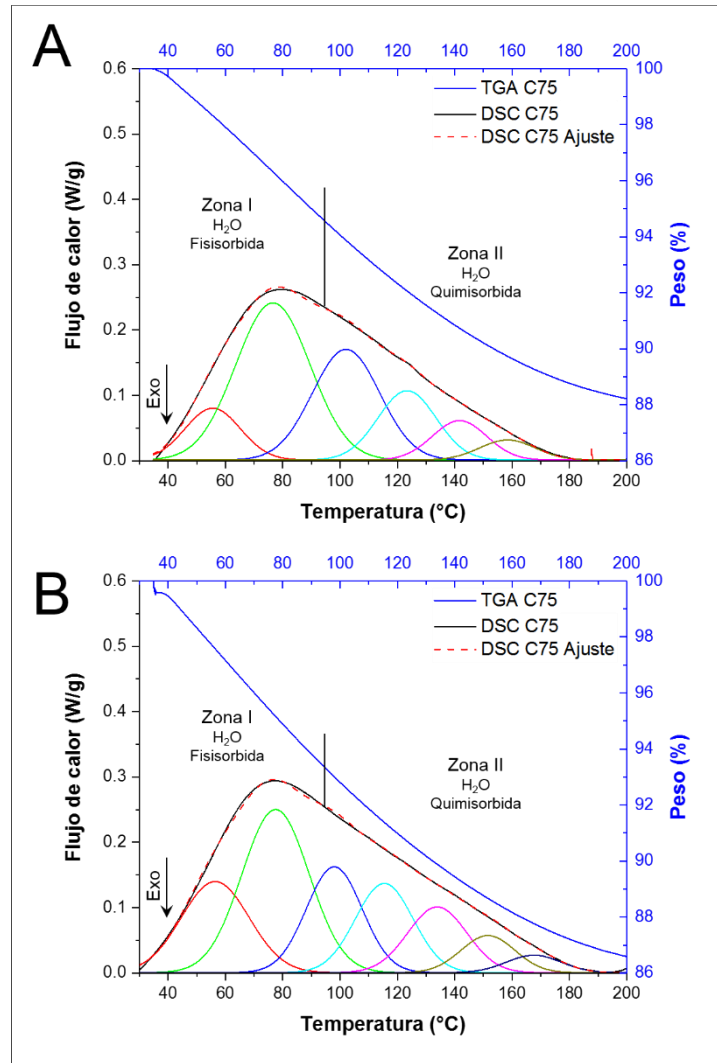


Figura 31. Termogramas de TGA y DSC de la membrana C75 a) sin y b) con entrecruzamiento.

Tabla 7. Porcentaje de agua fisisorbida y quimisorbida por las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento; y de la membrana comercial.

Membrana	Agua (%)			
	Fisisorbida		Quimisorbida	
	Sin EDC	Con EDC	Sin EDC	Con EDC
C0	28.8	30.5	71.2	69.5
C25	26.9	27.5	73.1	72.5
C50	38.2	44.7	61.8	55.3
C75	46.0	49.6	54.0	50.4
C100	50.4	53.3	49.6	46.7
Comercial	51.0		49.0	

5.4.4. Ensayo Mecánico

Las membranas ensayadas se hidrataron previamente con PBS a 37 °C, con el fin de caracterizarlas bajo condiciones similares a las que estarán sometidas en el interior del cuerpo. La capacidad de absorción de los hidrogeles está íntimamente relacionada con las propiedades mecánicas y estructurales de éstos, por lo tanto, su comportamiento elástico es altamente dependiente de la cantidad de líquido que pueden absorber (Anseth *et al.*, 1996 y Jeon *et al.*, 2007).

La respuesta mecánica bajo tensión uniaxial de las diferentes membranas sin y con entrecruzamiento se muestra en las Figuras 32a y b, respectivamente. En estas gráficas se puede observar que las membranas entrecruzadas con EDC presentan, en general, un menor porcentaje de deformación a la ruptura, pero un valor alto de esfuerzo último a la tensión (UTS) y módulo de Young (E). Debido a que la respuesta mecánica de los hidrogeles está fuertemente relacionada con su capacidad de absorción de líquido, se puede ver que un decremento en el porcentaje de absorción de PBS por las membranas implica un incremento en sus propiedades mecánicas ($\sigma_{\text{máx}}$ y E). Lo anterior se puede deber principalmente a dos razones: 1) una red polimérica entrecruzada tiene un menor espacio disponible para ser ocupada por las moléculas de agua debido a que se disminuye el tamaño de poro de la red y, 2) al limitar la movilidad de las cadenas poliméricas por el entrecruzamiento se aumenta la fuerza elástica que se opone a la absorción de líquido (Liu *et al.* 2009).

De acuerdo con D'Errico *et al.* 2008, el entrecruzamiento hace que las unidades monoméricas que forman parte de una cadena polimérica se unan covalentemente a otras unidades, generando nuevos puntos de unión entre ellas (puntos de entrecruzamiento) y conformando nuevas cadenas. Debido a que estas nuevas cadenas que integran la red polimérica están conformadas por menos unidades monoméricas, éstas son más cortas y de bajo peso molecular, por lo que el tamaño de poro de la red y el peso molecular entre puntos de entrecruzamiento también es menor.

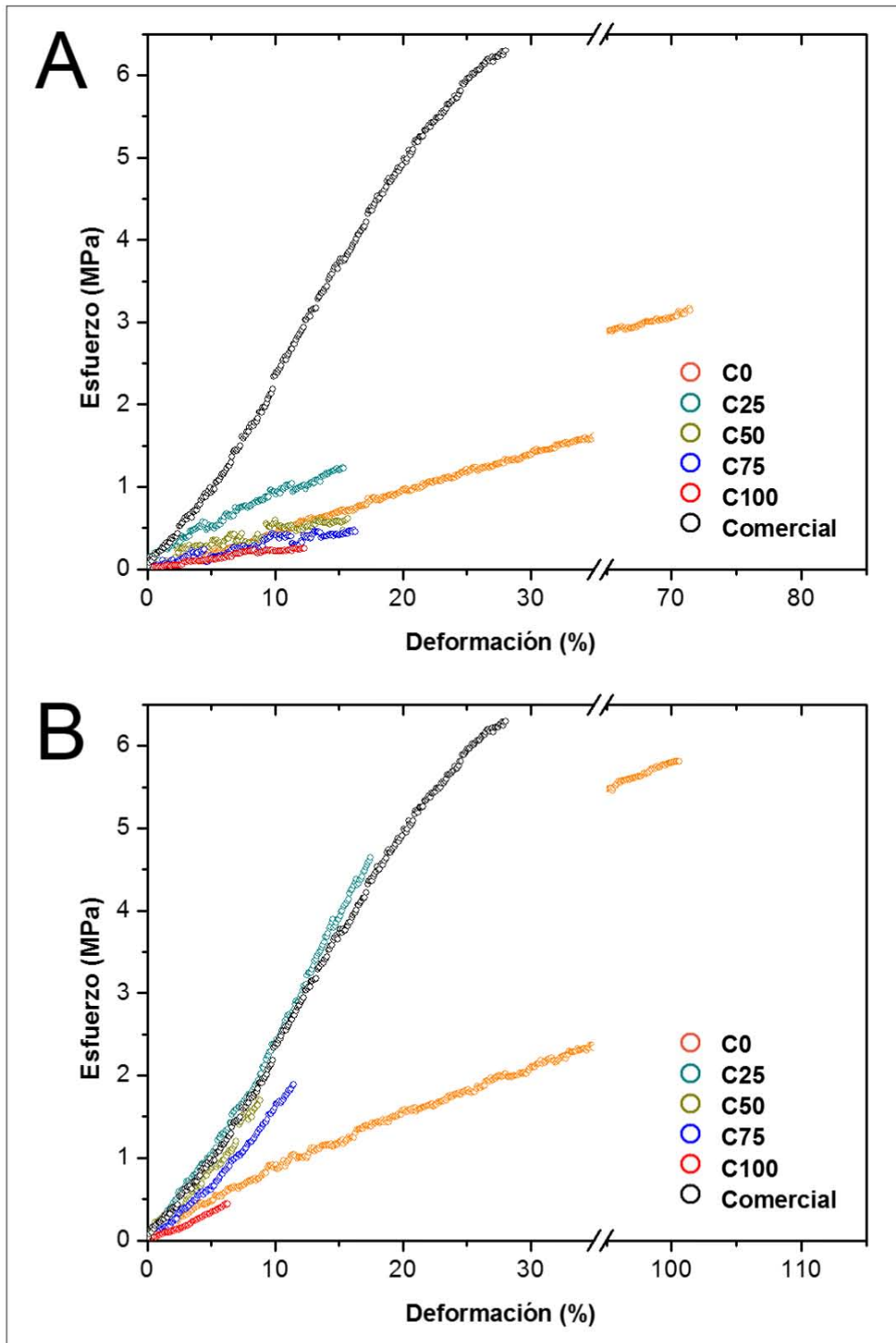


Figura 32. Curvas de esfuerzo-deformación de las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros a) sin y b) con entrecruzamiento; y de la membrana comercial.

En la Figura 33 se puede apreciar que el esfuerzo último a la tensión (UTS) de las diferentes membranas aumenta con la presencia del quitosán, esto se puede atribuir a que este polímero tiene un menor porcentaje de absorción de PBS que la colágena, lo que hace que se limite la movilidad de sus cadenas poliméricas y se incremente el esfuerzo último a la tensión. Como se mencionó anteriormente, las membranas entrecruzadas con EDC muestran un mayor esfuerzo último a la tensión que las membranas que no se entrecruzaron, sin embargo, las membranas C0 y C25 son las únicas que presentan una diferencia significativa con respecto al tratamiento (sin y con entrecruzamiento), según la prueba *post hoc* de Sidak. Igualmente, se puede ver que el esfuerzo último a la tensión de las membranas C0 y C25 entrecruzadas es muy semejante al de la membrana comercial al no existir una diferencia significativa entre ellas, de acuerdo con la prueba *post hoc* de Dunnet.

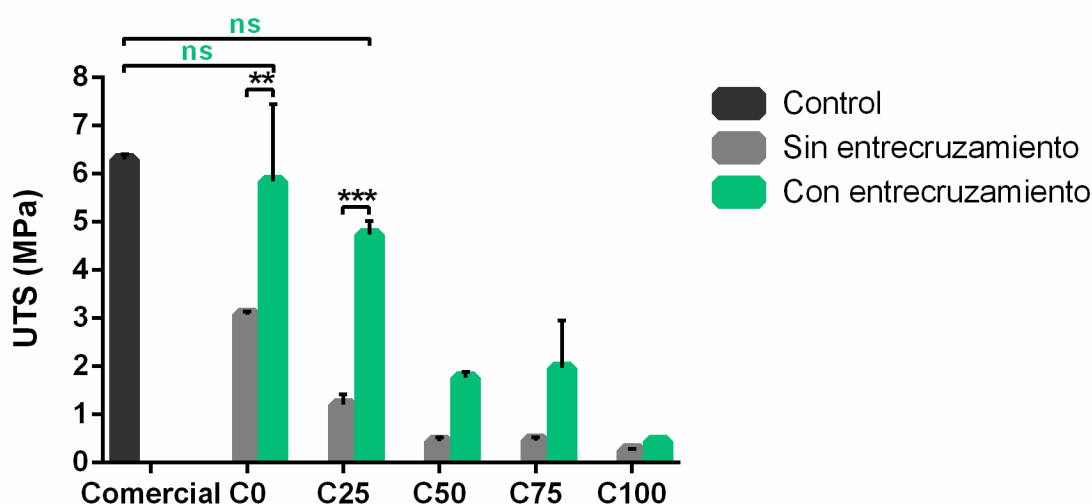


Figura 33. Esfuerzo último a la tensión de las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento; y de la membrana comercial (**ns** indica que no existe diferencia significativa entre el control y las diferentes membranas elaboradas y; ****** y ******* denota que existe diferencia significativa entre las distintas membranas sin entrecruzar y entrecruzadas).

En la Figura 34 se puede observar que el módulo de Young (E) de las membranas de quitosán es bajo, no obstante, sólo basta con aumentar un poco la proporción de colágena para que este parámetro se incremente y, si se continúa aumentando la proporción de proteína, el módulo elástico decrece gradualmente. Al igual que en el esfuerzo último a la tensión, el módulo de Young aumenta por el entrecruzamiento con

EDC, sin embargo, sólo las membranas de colágena-quitosán (C25, C50 y C75) son las únicas que muestran una diferencia significativa con respecto al tratamiento (sin y con entrecruzamiento). Asimismo, se puede ver que el módulo elástico de las membranas C25 y C50 entrecruzadas es muy similar al de la membrana comercial al no existir una diferencia significativa entre ellas.

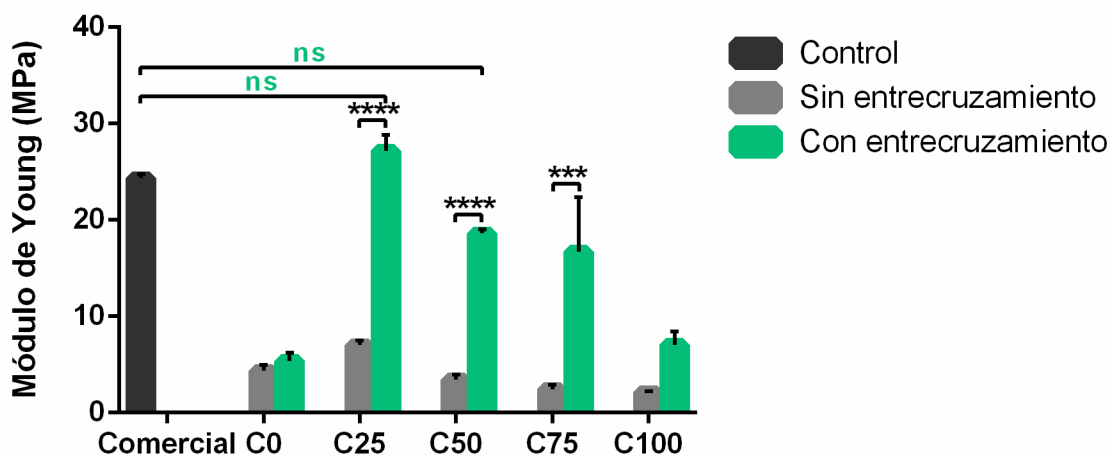


Figura 34. Módulo de Young de las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento; y de la membrana comercial (**ns** indica que no existe diferencia significancia entre el control y las diferentes membranas elaboradas y; ******* y ******** denota que existe diferencia significativa entre las distintas membranas sin entrecruzar y entrecruzadas).

Por lo tanto, después de analizar estos resultados, se puede decir que la membrana C25 entrecruzada con EDC es la única membrana elaborada que muestra un valor de esfuerzo último a la tensión y módulo de Young semejante al de la membrana comercial.

5.4.5. Degradación *in vitro*

Los andamios para la ingeniería de tejidos deben ser degradables y eventualmente deben ser eliminados del cuerpo, ya que tienen que ser reemplazados por nuevo tejido. Dependiendo del tejido a reparar, los andamios deben tener una vida media efectiva en la que la degradación no sea inmediatamente después de ser implantados, o bien, que tarden mucho en degradarse. Además, los subproductos de la degradación tampoco deben ser tóxicos y no deben interferir con la función de los órganos (O'Brien, 2011; Collins y Birkinshaw, 2013).

Los polímeros naturales, como la colágena y el quitosán, presentan una alta tasa de degradación enzimática, reduciendo sus posibles aplicaciones biomédicas (Krishnamoorthy *et al.*, 2014). La estabilidad de una membrana, en términos de degradación enzimática, es muy importante debido a que este sustrato debe separar el tejido óseo del conjuntivo el tiempo suficiente para permitir que se lleve a cabo una adecuada reparación ósea.

La degradabilidad de las membranas se evaluó mediante el monitoreo del porcentaje de la masa residual de éstas después de diferentes tiempos de incubación en una disolución de lisozima a una concentración de 112 000 U/mL, que corresponde a 1000 veces la concentración normal de esta enzima en el plasma humano (112 U/mL) (Brouwer *et al.*, 1984; Porstmann *et al.*, 1989). La razón por la se decidió usar una alta concentración de lisozima fue con el fin de acelerar el proceso de digestión enzimática y, de esta manera, poder conocer el comportamiento de degradación de las membranas a corto plazo.

Las cinéticas de degradación de las diferentes membranas sin y con entrecruzamiento se muestran en las Figuras 35a y b, respectivamente. En estas gráficas se puede observar que las membranas entrecruzadas con EDC se disuelven más lentamente (degradación por debajo del 20 %) que las que no se entrecruzaron (degradación hasta del 80 %). La disminución del porcentaje de degradación se puede deber a la formación de nuevos enlaces covalentes por el entrecruzamiento que hace que la enzima tenga que escindir una mayor cantidad de enlaces y, por lo tanto, la resistencia a la degradación sea mayor.

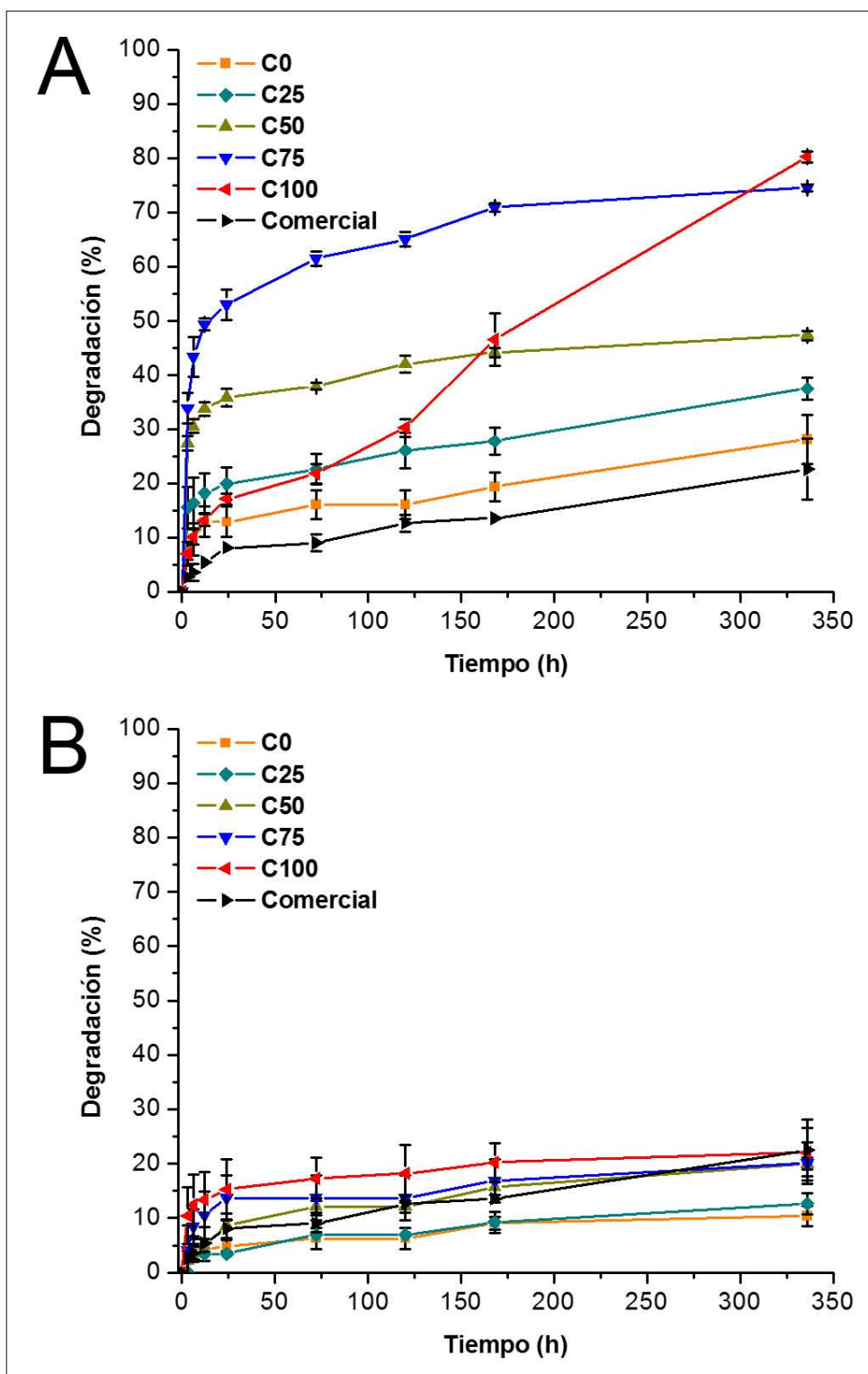


Figura 35. Cinética de degradación enzimática de las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros a) sin y b) con entrecruzamiento; y de la membrana comercial utilizando lisozima.

En la Figura 36 se puede apreciar que el porcentaje de degradación de las diferentes membranas disminuye con la presencia del quitosán. Como se mencionó anteriormente, las membranas entrecruzadas con EDC presentan un menor porcentaje de degradación que las que no se entrecruzaron, teniendo que todas las membranas muestran una diferencia significativa con respecto al tratamiento (sin y con entrecruzamiento), de acuerdo con la prueba *post hoc* de Sidak. Incluso, se puede ver que algunas de las membranas elaboradas (C0 y C25 entrecruzadas) presentan un menor porcentaje de degradación que la membrana comercial habiendo una diferencia significativa entre ellas, según la prueba *post hoc* de Dunnet.

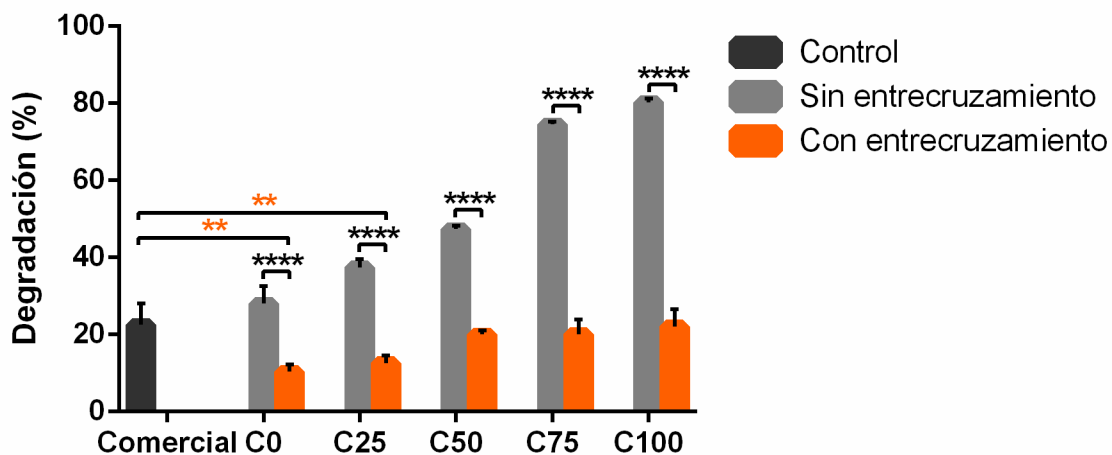


Figura 36. Degradación enzimática de las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento; y de la membrana comercial utilizando lisozima (** indica que existe diferencia significativa entre el control y las diferentes membranas elaboradas y; **** denota que existe diferencia significativa entre las distintas membranas sin entrecruzar y entrecruzadas).

Con el fin de conocer los cambios morfológicos de las membranas después de la digestión enzimática, se seleccionó la membrana C100 para observarla en el microscopio electrónico de barrido debido a que esta membrana muestra el mayor porcentaje de degradación. La morfología de la membrana C100 sin y con entrecruzamiento después de 14 días de incubación con la lisozima se presenta en las Figuras 37a y b, respectivamente. En estas micrografías se puede observar que algunas características físicas de las membranas se modifican con la digestión enzimática, por ejemplo, en la membrana sin entrecruzar el diámetro se reduce, la superficie se ve desgastada y el contorno es irregular, no obstante, en la membrana entrecruzada con EDC estos cambios

físicos son mínimos. Es importante mencionar que, a pesar de que no se muestran los espesores de las membranas, también se pudo ver que este parámetro físico se modifica con la digestión enzimática, teniendo que el espesor disminuye en la membrana sin entrecruzar en comparación con la que no se entrecruzó. Por lo tanto, el uso de EDC resulta un método efectivo para mejorar la estabilidad de las membranas previniendo la digestión provocada por la lisozima.

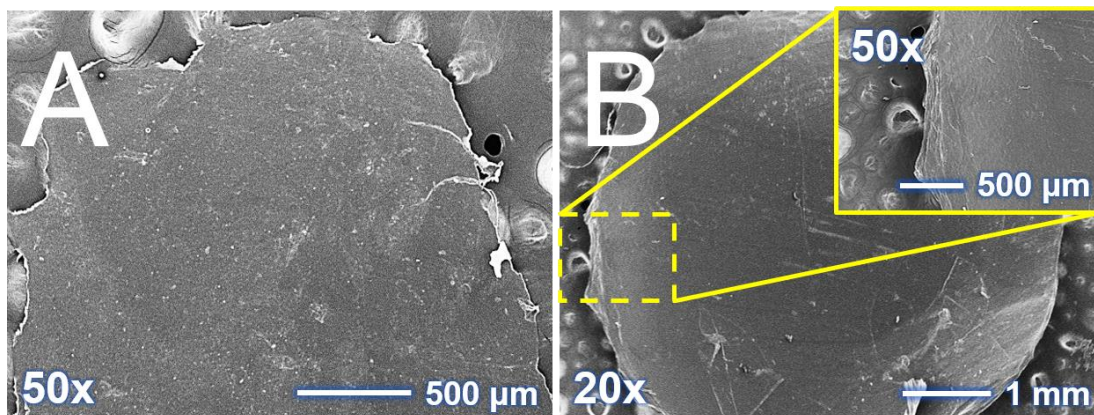


Figura 37. Morfología de la membrana C100 a) sin y b) con entrecruzamiento después de 14 días de incubación con la lisozima.

5.4.6. Morfología

La morfología de la superficie de las diferentes membranas sin y con entrecruzamiento se muestra en las Figuras 38 y 39. En estas micrografías se puede observar que las membranas de colágena-quitosán (C25, C50 y C75) son homogéneas, es decir, no presentan fases que indiquen la separación de los polímeros empleados. Lo anterior se puede atribuir a que la colágena y el quitosán son de carácter hidrófilo, lo que hace que se favorezca la miscibilidad de los polímeros en las mezclas elaboradas. Igualmente, se puede ver que la rugosidad de las membranas aumenta con la presencia de la colágena. De acuerdo con las ampliaciones observadas (500 y 1000x), se puede apreciar que la morfología de la membrana C0 es lisa; la de las membranas C25 y C50 es rugosa y; la de las membranas C75 y C100, además de que es rugosa, se puede ver la presencia de las fibras de colágena. Asimismo, se puede ver que las membranas entrecruzadas con EDC muestran una morfología muy similar a las que no se entrecruzaron. Según Li *et al.*, 2013,

la rugosidad de la superficie de los andamios es favorable para la adhesión celular, lo cual se discute más adelante en los ensayos biológicos.

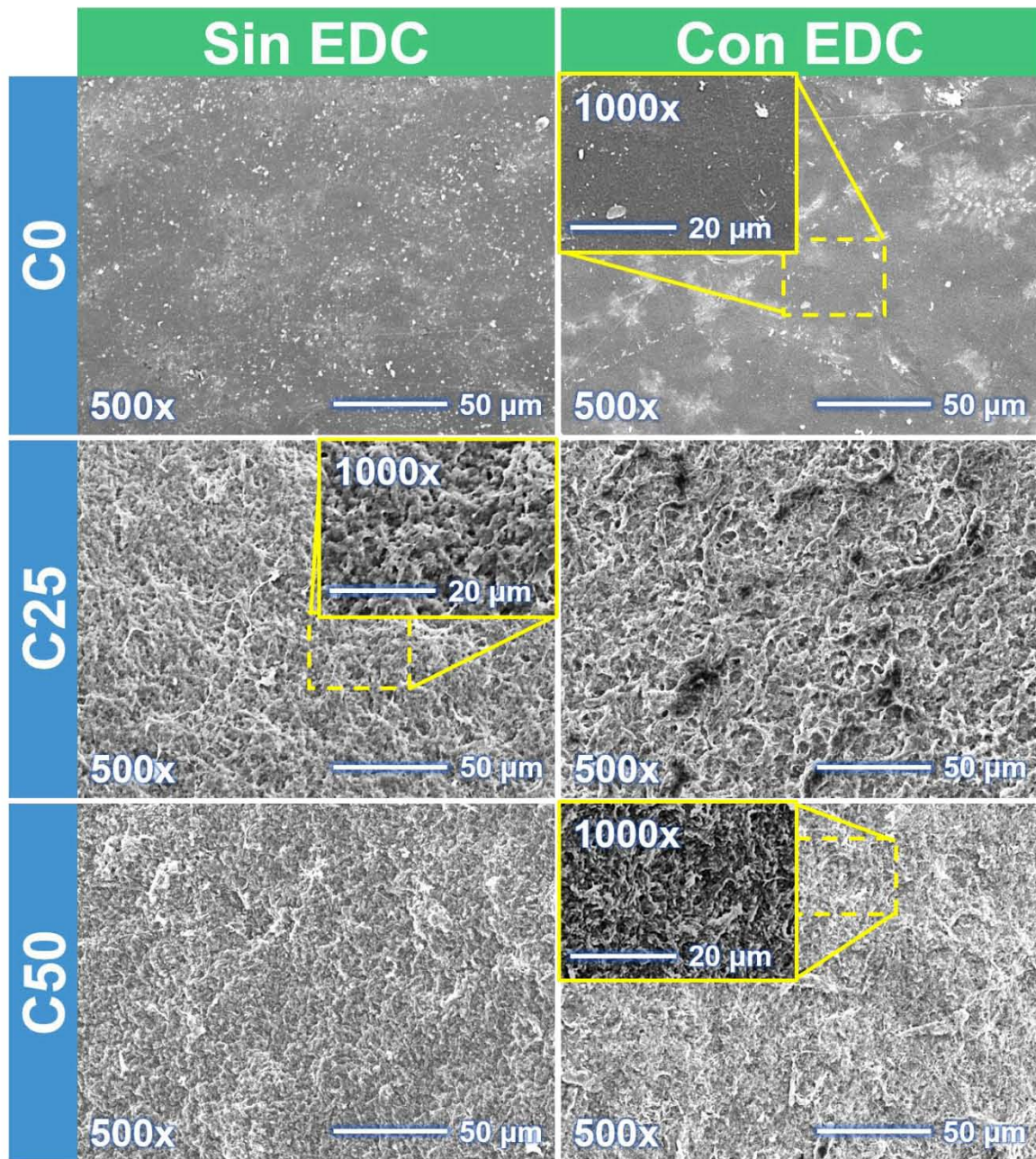


Figura 38. Morfología de la superficie de las membranas C0, C25 y C50 sin y con entrecruzamiento.

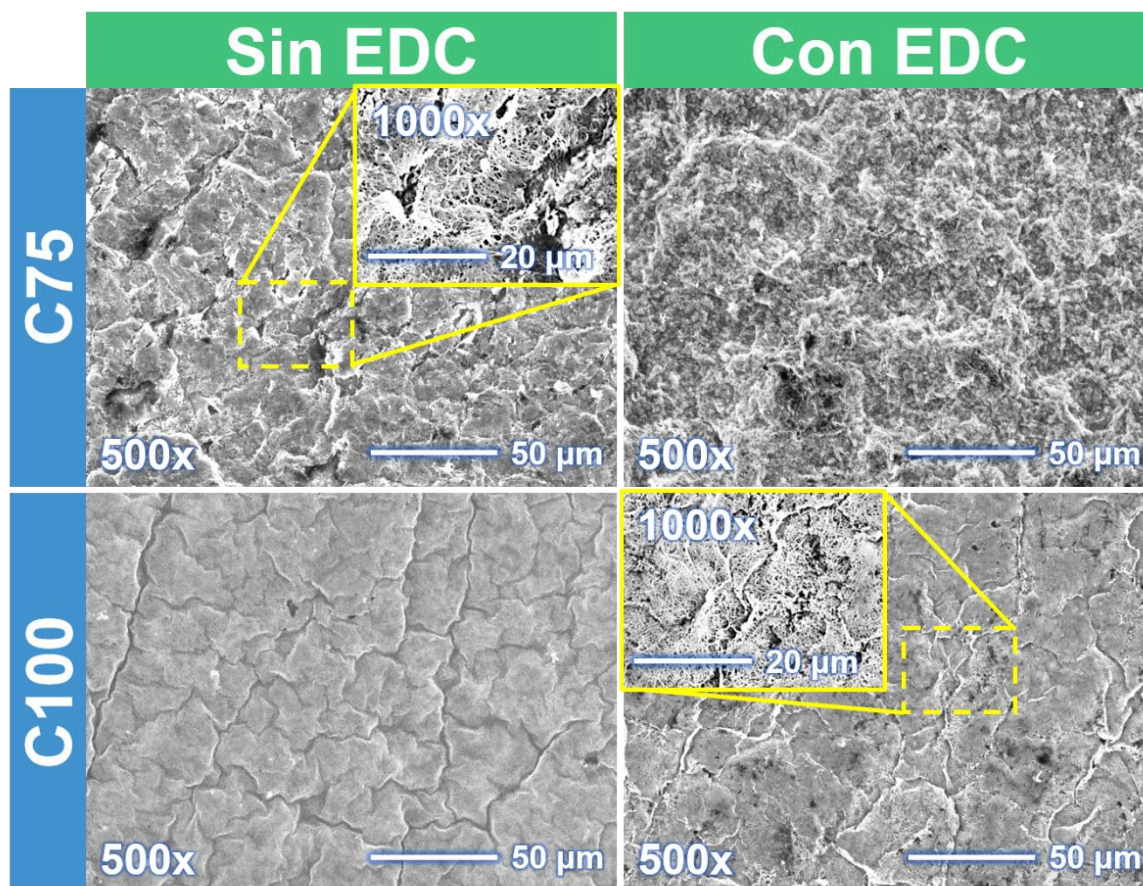


Figura 39. Morfología de la superficie de las membranas C75 y C100 sin y con entrecruzamiento.

En el caso de la morfología de la membrana comercial (Figura 40), a pesar de que es rugosa, se esperaba que hubiese presentado una morfología muy similar a la de la membrana C100 debido a que ambas membranas están elaboradas de sólo colágena, sin embargo, una posible explicación a esto es que se hayan utilizado diferentes condiciones de secado de las disoluciones. Además, en la membrana comercial se pudo observar la presencia de bacilos, los cuales son bacterias con forma de bastones. De acuerdo con la hoja técnica de la membrana comercial, ésta se esterilizó con radiación gamma (γ), no obstante, con el fin de saber si estos bacilos se encontraban vivos o muertos, se tomó una muestra de la membrana comercial y se incubó en agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) a 37 °C por 24 h. Al término del periodo de incubación, se pudo ver la ausencia de microorganismos, por lo que se puede decir que las bacterias que pudieron haber estado presentes en la membrana se murieron con la radiación γ . Los rayos γ son ondas electromagnéticas de alta energía por su corta longitud de onda. En el proceso de

irradiación γ , esta energía se transfiere a los electrones de las moléculas de los productos irradiados generando radicales altamente reactivos. Estos radicales libres dañan el material genético de los microorganismos presentes, provocando su muerte e impidiendo que puedan multiplicarse. Como resultado, el producto irradiado se vuelve estéril (Fairand, 2001).

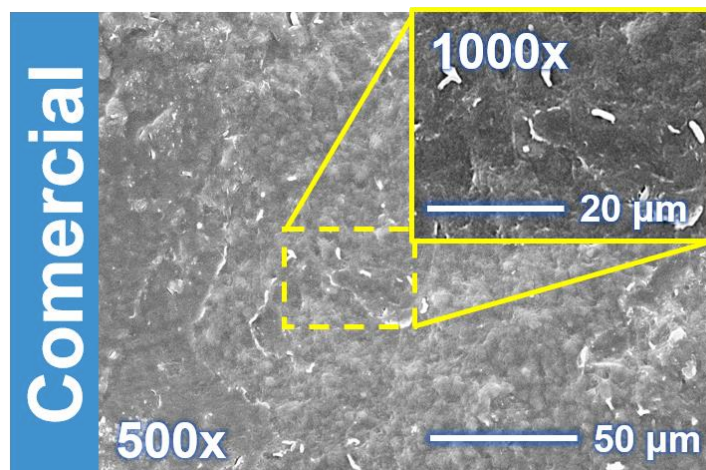


Figura 40. Morfología de la superficie de la membrana comercial.

Uno de los objetivos perseguidos en estas membranas es que funcionen como separadoras de tejidos, por lo que es importante conocer la morfología de su vista transversal para saber si puede existir alguna infiltración de tejidos celulares no deseados. La morfología de la vista transversal de las diferentes membranas sin y con entrecruzamiento se muestra en las Figuras 41 y 42. En estas micrografías se puede observar diferencias principalmente en la compactación de las membranas. Según las ampliaciones observadas (1000 y 1500x), la mayoría de las membranas incluyendo a la comercial (Figura 43), tienen un espesor muy compacto sin la presencia de poros, excepto por la membrana C100 en la que se alcanza a ver una gran cantidad de poros muy pequeños. Al igual que en la morfología de la superficie, la morfología de la vista transversal de las membranas entrecruzadas con EDC es muy similar a las que no se entrecruzaron. Por lo tanto, se puede decir que la técnica de evaporación del disolvente es adecuada para la elaboración de membranas separadoras de tejidos.

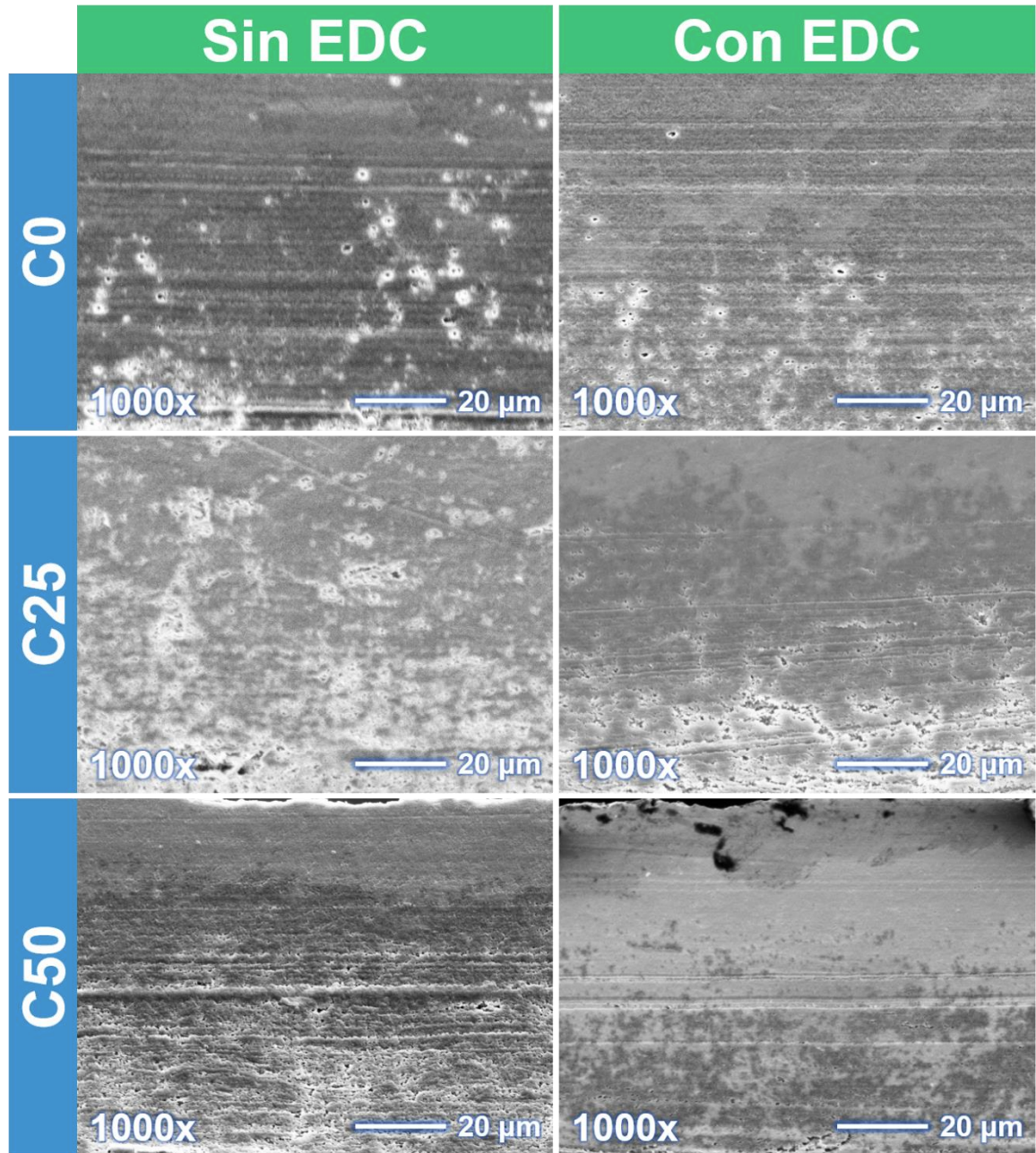


Figura 41. Morfología de la vista transversal de las membranas C0, C25 y C50 sin y con entrecruzamiento.

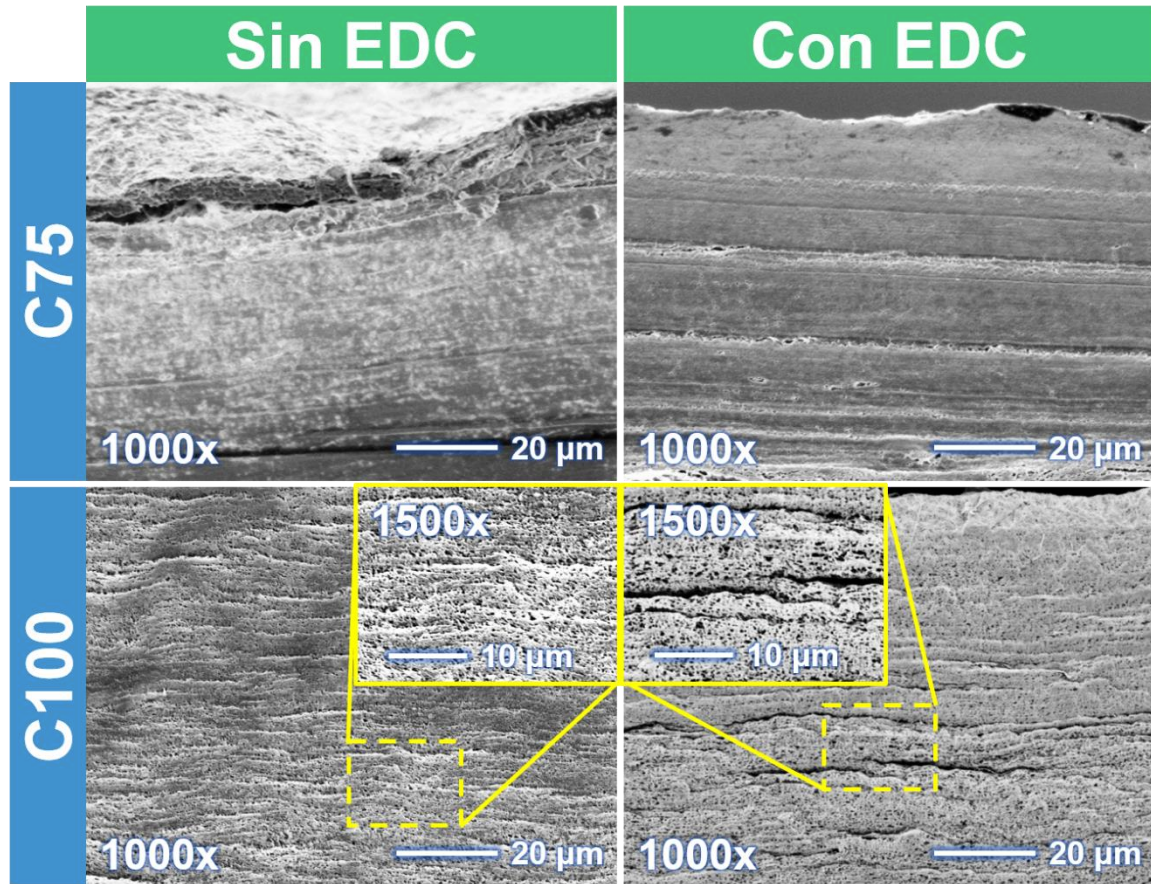


Figura 42. Morfología de la vista transversal de las membranas C75 y C100 sin y con entrecruzamiento.

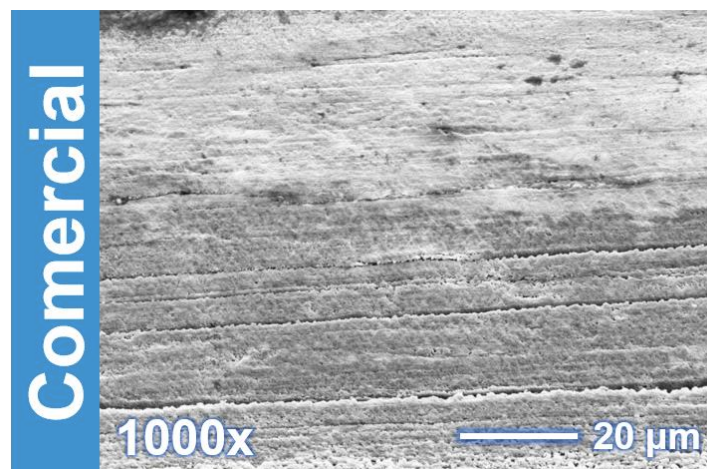


Figura 43. Morfología de la vista transversal de la membrana comercial.

En la Figura 44 se puede apreciar la vista transversal de la membrana C100 a un menor aumento, en la que se puede ver que la colágena se deposita en capas habiendo espacios entre éstas. Igualmente, en la Figura 45 se puede observar la superficie de una de las capas internas que componen a la membrana pudiendo ver que hay una gran cantidad de fibras de colágena entrelazadas formando una red. Lo anterior puede explicar el hecho de que esta membrana alcance un alto porcentaje de absorción de PBS en comparación con las demás membranas elaboradas y la comercial.

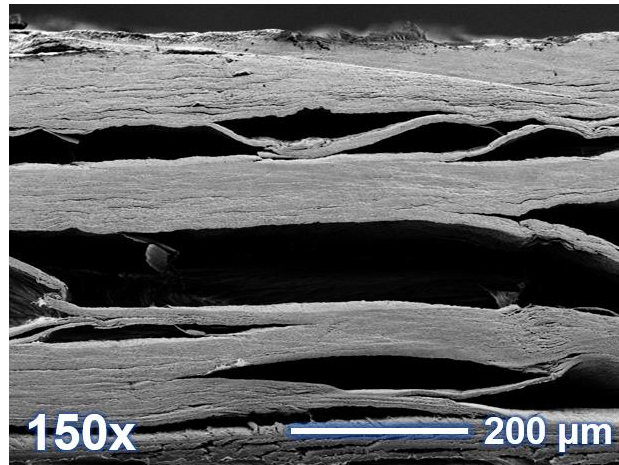


Figura 44. Morfología de la vista transversal de la membrana C100.

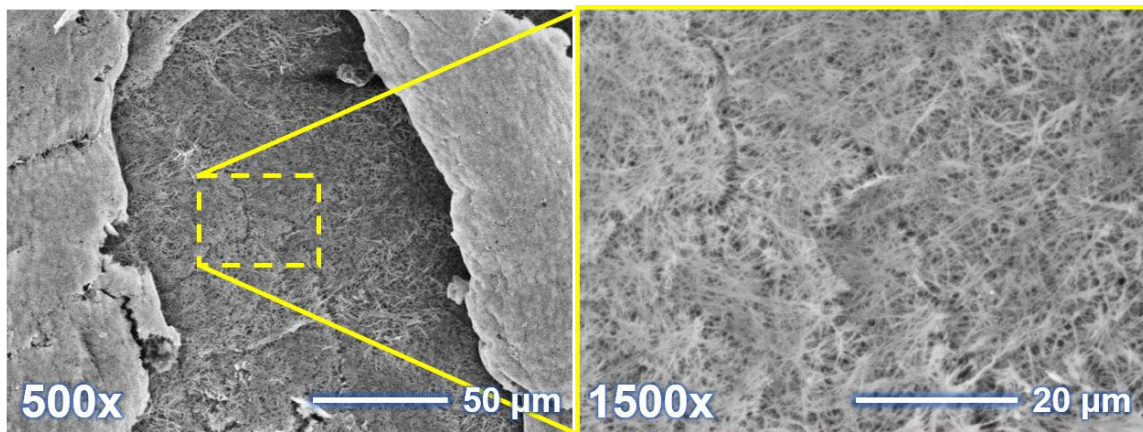


Figura 45. Morfología de la superficie de una de las capas internas de la membrana C100.

5.5. Caracterización Biológica de las Membranas de Colágena-Quitósán

Debido a que las propiedades de los andamios incluyendo su composición química, capacidad de absorción de líquido, módulo elástico y rugosidad, pueden influir en la respuesta celular, entender la interacción *in vitro* célula-andamio es un primer paso para predecir la viabilidad de las membranas que pretenden ser usadas en la separación de tejidos (He y Xiong, 2012).

5.5.1. Adhesión Celular

La diferenciación y proliferación de las células sobre los andamios están influenciadas por la adhesión y diseminación celular durante la primera fase de cultivo en los andamios. De esta forma, la adhesión de las células constituye uno de los prerequisites para evaluar la biocompatibilidad de las membranas.

Para cuantificar la adhesión celular presentada en las membranas se utilizó la prueba de absorbancia con el cristal violeta a las 4 h de cultivo. Los valores de absorbancia se convirtieron a porcentajes de células adheridas considerando que la placa de cultivo correspondía el 100 % de adhesión, ya que la placa empleada cuenta con un tratamiento de fábrica para promover la adhesión de las células. Los porcentajes de adhesión de los osteoblastos fetales humanos (hFOB) en las diferentes membranas sin y con entrecruzamiento se muestran en la Figura 46. En esta gráfica se puede observar que la adhesión de las células hFOB se relaciona directamente con la morfología de las membranas (Sección 5.4.6.), teniendo en cuenta que mientras más rugosa es la superficie de éstas mayor es la adhesión celular, coincidiendo con lo reportado por Li *et al.*, 2013. Otro hecho que confirma la relación entre la adhesión y morfología de las células es, que al igual que en la morfología de las membranas, la adhesión celular no se ve afectada por el entrecruzamiento con EDC, teniendo como resultado que todas las membranas no presentan una diferencia significativa con respecto al tratamiento (sin y con entrecruzamiento), de acuerdo con la prueba *post hoc* de Sidak. Asimismo, se puede ver que las membranas elaboradas muestran un mayor porcentaje de adhesión de las células (75-125 %) que la membrana comercial (60 %) habiendo una diferencia significativa entre ellas, según la prueba *post hoc* de Dunnet.

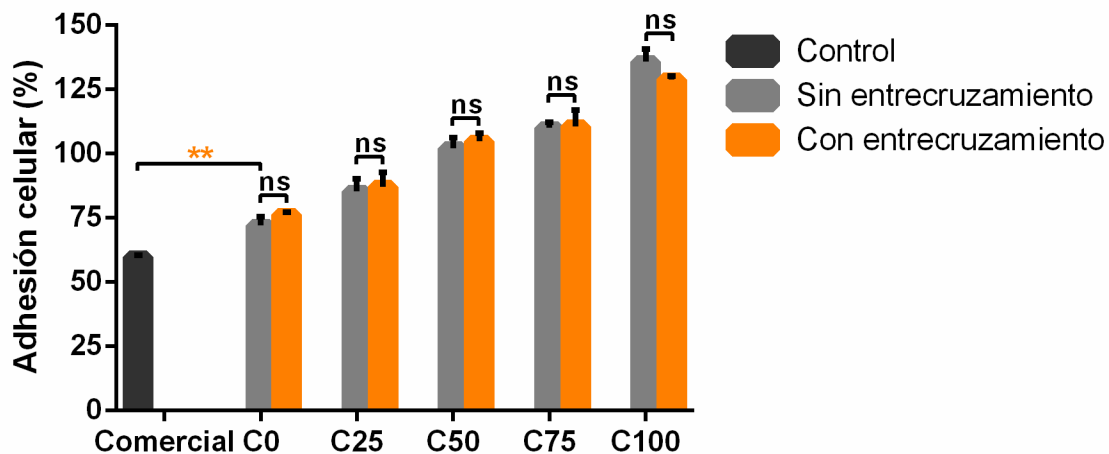


Figura 46. Porcentaje de adhesión de las células hFOB en las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento; y de la membrana comercial después de 4 h de cultivo (** indica que existe diferencia significativa entre el control y las diferentes membranas elaboradas y; **ns** denota que no existe diferencia significativa entre las distintas membranas sin entrecruzar y entrecruzadas).

5.5.2. Viabilidad Celular

Una buena respuesta de adhesión celular es indicativo de que las membranas no afectan biológicamente a las células. Para corroborar lo anterior, se evaluó la viabilidad celular por medio del kit de conteo celular-8 (CCK-8) cuantificándose la densidad óptica (D.O.) a 450 nm. El CCK-8 indica el estado del metabolismo de las células mediante el cambio de color de las sales de tetrazolio al ser reducidas a formazán cuando son incubadas con células viables. Así, el ensayo únicamente detecta células vivas y la intensidad de la señal generada depende de la cantidad de éstas.

La densidad óptica del formazán producido por los osteoblastos fetales humanos (hFOB) en las diferentes membranas sin y con entrecruzamiento durante los primeros 14 días de cultivo se muestra en las Figuras 47a y b, respectivamente. En estas gráficas se puede observar que con el transcurso de los días hay un aumento gradual en la densidad óptica tanto en las membranas entrecruzadas con EDC como en las membranas que no se entrecruzaron. Este incremento en la densidad óptica se debe a una mayor producción de formazán como resultado de la actividad metabólica de las células hFOB. De esta manera, un aumento en la densidad óptica señala indirectamente un incremento en la viabilidad o proliferación de las células.

Así como la adhesión celular se relaciona con la morfología de las membranas, la viabilidad de las células también se relaciona con la adhesión de éstas, al tener que los resultados obtenidos en ambos ensayos siguen la misma tendencia. Igualmente, es importante destacar, que al igual que en la adhesión celular, la viabilidad de las células en las membranas elaboradas es mayor que en la membrana comercial.

Debido a que las membranas entrecruzadas presentan un perfil muy similar de viabilidad celular al de las membranas que no se entrecruzaron y, además, en ambos tipos de membranas la viabilidad de las células aumenta a lo largo de todo el ensayo, es posible establecer que las membranas entrecruzadas no son citotóxicas. Lo anterior se puede atribuir a la naturaleza del EDC, ya que es un agente entrecruzante que no forma parte del producto final. Por lo tanto, las membranas entrecruzadas pueden ser consideradas potencialmente como andamios celulares en la regeneración de tejidos, concretamente, para su uso en la regeneración ósea guiada.

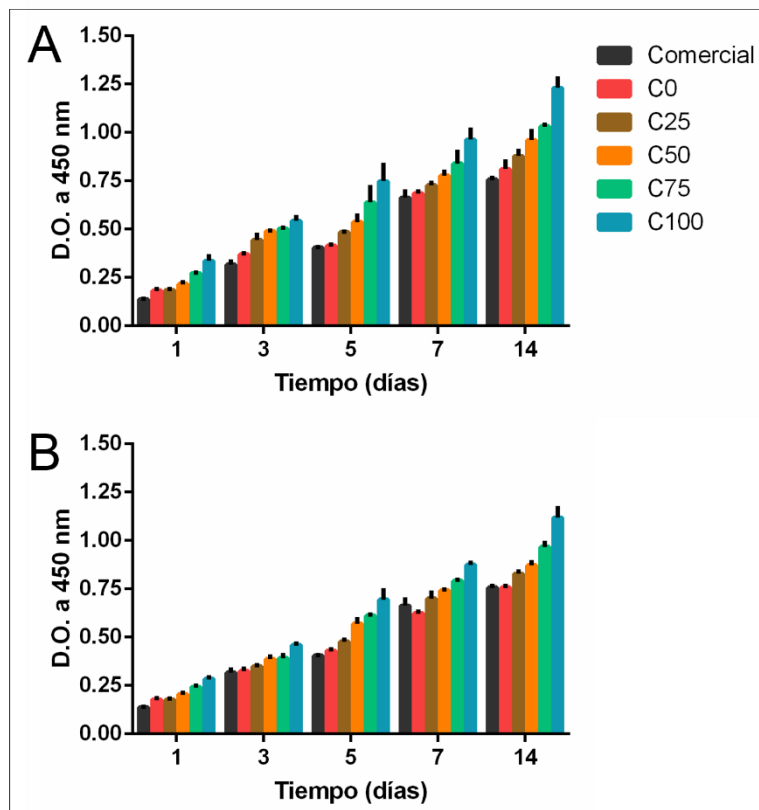


Figura 47. Viabilidad de las células hFOB sembradas sobre las membranas de colágena-quitósán y de sus componentes puros a) sin y b) con entrecruzamiento; y de la membrana comercial al día 1, 3, 5, 7 y 14 de cultivo.

5.5.3. Morfología Celular

De acuerdo con McKenzie y Webster, 2009, la morfología de las células puede proporcionar evidencia de su grado de compatibilidad con el material. De esta forma, un indicador de que una célula interactúa bien con el material empleado como andamio, es la rapidez con la que se extiende sobre la superficie y pierde la forma esférica que asumió mientras se encontraba en medio acuoso (suspensión celular).

La interacción de los osteoblastos fetales humanos (hFOB) sobre las diferentes membranas sin y con entrecruzamiento a las 24 h de cultivo se muestra en las Figuras 48 y 49. En estas micrografías, se puede observar que las células hFOB son capaces de colonizar y extenderse sobre la superficie de las membranas sugiriendo una buena compatibilidad entre ellos. Asimismo, se puede ver que la cantidad de células adheridas por área se favorece con la presencia de la colágena independientemente del tratamiento, coincidiendo con los resultados obtenidos del ensayo de adhesión celular (Sección 5.5.1.).

En la membrana C0 sin entrecruzar y entrecruzada, las células se encuentran aisladas o en pequeños grupos dispersos presentando un citoplasma plano y redondeado con múltiples y largas extensiones citoplasmáticas. Una morfología redonda de las células indica una pobre adherencia a la superficie de las membranas. Lo anterior se puede deber a que la superficie de estas membranas es menos rugosa que el resto (Sección 5.4.6.), dificultando, de esta manera, el anclaje de las células en este tipo de morfologías. Igualmente, es importante mencionar que el citoplasma de algunas células sembradas sobre la membrana C0 sin entrecruzar se encuentra dañado, lo cual se puede atribuir a que la metodología que se empleó para la preparación de esta muestra es inconveniente para células con poca adherencia.

En las demás membranas (C25, C50, C75 y C100 sin entrecruzar y entrecruzadas), se exhibieron células con una morfología característica de células hFOB (morfología poliédrica). Asimismo, se pueden apreciar algunos puntos de adhesión de las células (filopodios) al estar en contacto con la superficie de las membranas, lo cual se puede interpretar como una respuesta biológica a la morfología de las membranas. Esta respuesta es importante ya que proporciona un ambiente adecuado para que se lleve a cabo la adhesión celular para que posteriormente las células puedan proliferar. Igualmente, se puede ver que algunas células sintetizaron matriz extracelular (MEC). La síntesis de MEC por parte de las células es un indicativo más de su adhesión a las

membranas, debido a que es sabido que las células dependen de su adhesión a un sustrato para su crecimiento, proliferación y síntesis de MEC (Narayan, 2009). A pesar de observarse una morfología celular muy similar en las membranas sin entrecruzar y entrecruzadas, se pueden ver algunas diferencias morfológicas mínimas. Por ejemplo, mientras las células en las membranas sin entrecruzar muestran una morfología con prominencias nucleares, las células en las membranas entrecruzadas presentan una morfología más plana. Por lo tanto, de los resultados obtenidos se puede sugerir que la morfología y composición química de las membranas tienen una fuerte influencia en la adhesión, viabilidad y morfología celular.

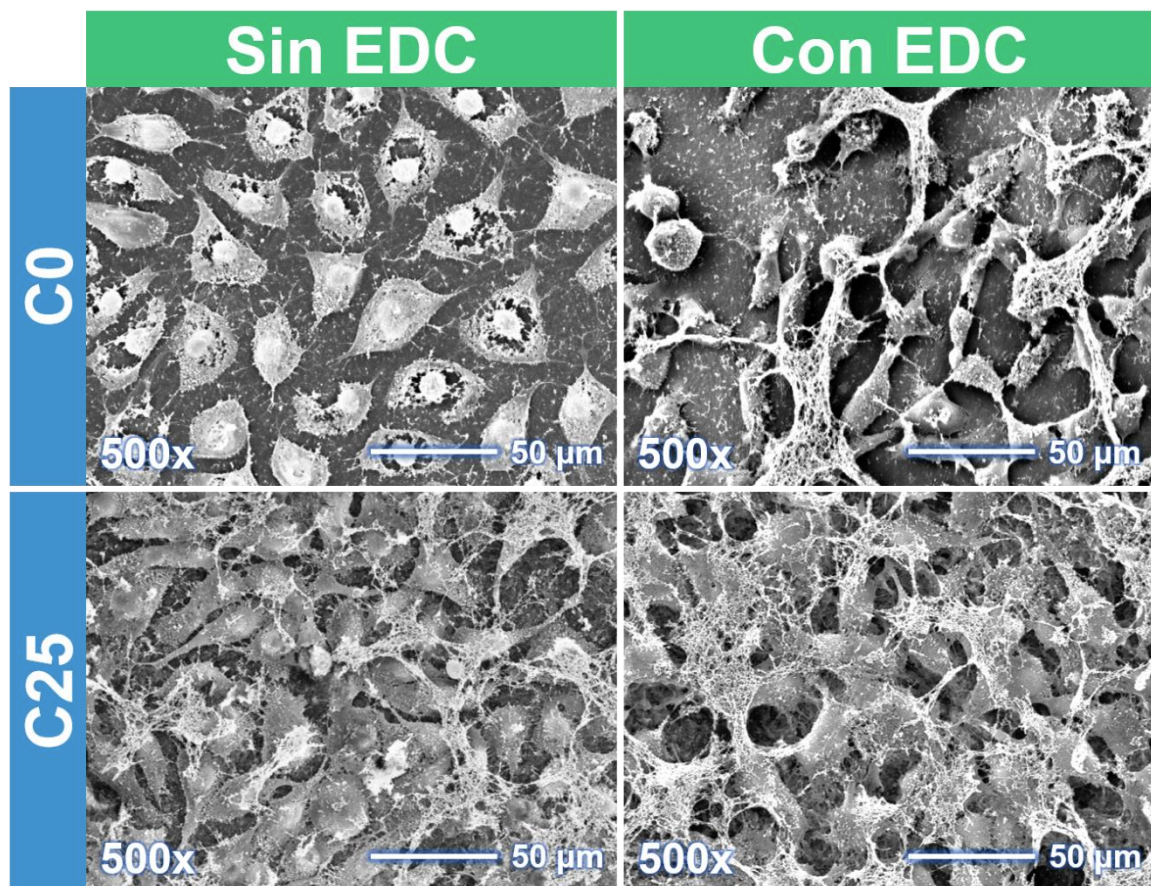


Figura 48. Morfología de las células hFOB sembradas sobre las membranas C0 y C25 sin y con entrecruzamiento a las 24 h de cultivo.

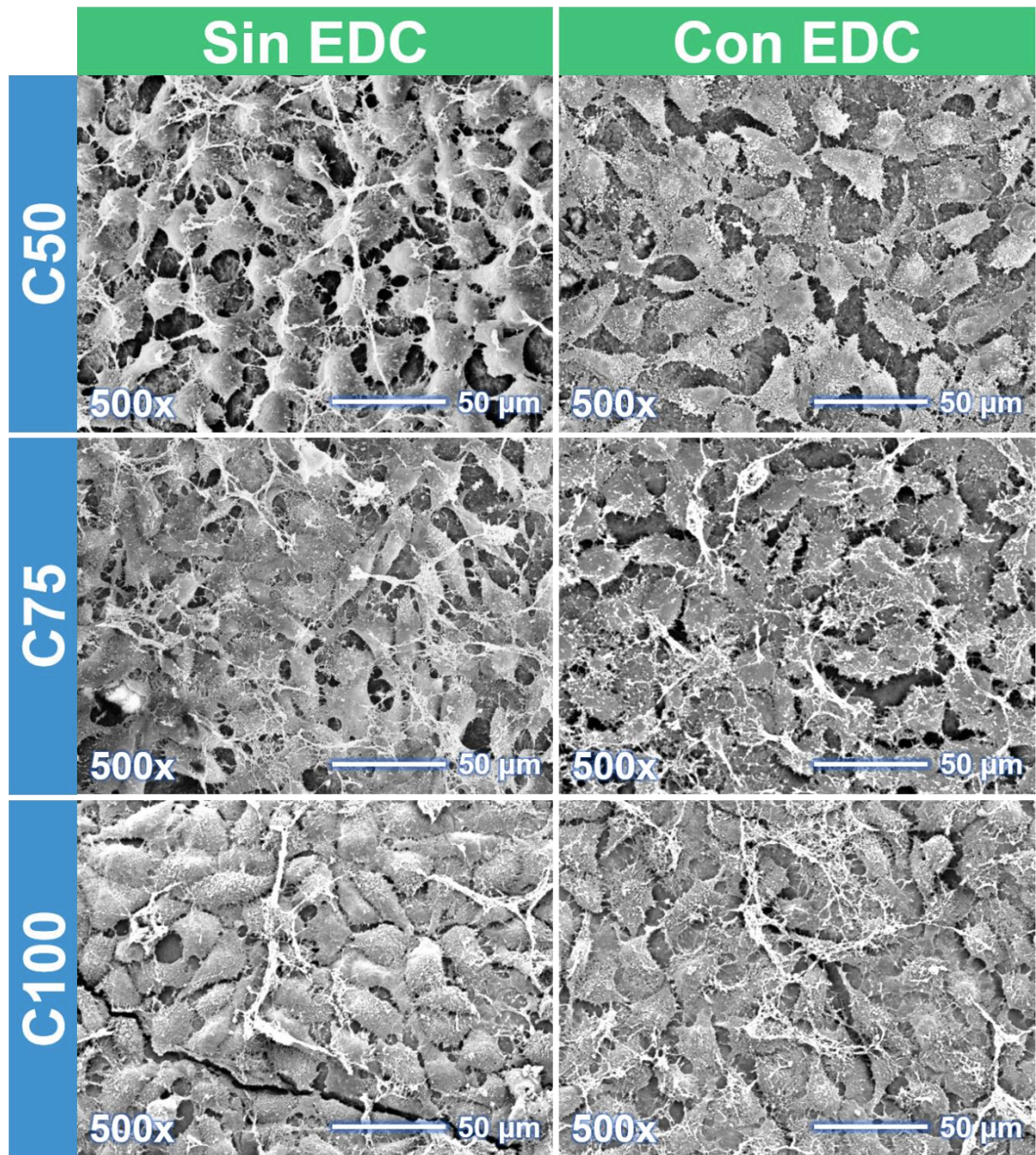


Figura 49. Morfología de las células hFOB sembradas sobre las membranas C50, C75 y C100 sin y con entrecruzamiento a las 24 h de cultivo.

6. Conclusiones

- El método propuesto para la extracción y purificación de la colágena tipo I tiene un alto rendimiento en comparación con otros procesos. Además, la colágena tipo I obtenida posee un alto grado de pureza, lo que indica que la metodología empleada es adecuada para la obtención de la proteína.
- El método utilizado para la extracción de quitina y su conversión a quitosán permite obtener productos con un alto grado de desacetilación y un peso molecular apropiado para la elaboración de las membranas.
- La técnica de evaporación del disolvente es adecuada para la elaboración de membranas separadoras de tejidos.
- La espectroscopía de infrarrojo indicó que las moléculas de colágena y quitosán no se ven afectadas por el entrecruzamiento con EDC. El análisis térmico, el ensayo mecánico y la prueba de degradación *in vitro*, mostraron que las membranas entrecruzadas químicamente son más resistentes a la deshidratación, tensión y digestión enzimática. La microscopía electrónica de barrido reveló que las membranas presentan una morfología rugosa que es adecuada para la adhesión celular y no se ve afectada por el entrecruzamiento.
- Los estudios de adhesión, viabilidad y morfología celular sugirieron que el entrecruzamiento con EDC no afecta las excelentes características biológicas de las membranas.
- Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que es posible obtener membranas a base de colágena y quitosán entrecruzadas con EDC para poder ser aplicadas en la regeneración ósea guiada.

7. Referencias

- Abou Neel, E.A., Bozec, L., Knowles, J.C., Syed, O., Mudera, V. y Daye, R. (2013). Collagen-emerging collagen based therapies hit the patient. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(4), 429-456.
- Ahn, Y.-S., Kim, S.-G., Kim, C.-S., Oh, J.-S. y Lim, S.-C. (2012). Effect of guided bone regeneration with or without pericardium bioabsorbable membrane on bone formation. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, 114(5), 126-131.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. (2002). *Biología Molecular de la Célula* (3a ed.). España: Omega, S.A.
- Angele, P., Abke, J., Kujat, R., Faltermeier, H., Schumann, D., Nerlich, M., Kinner, B., Englert, C., Ruszczak, Z., Mehrl, R. y Mueller, R. (2004). Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. *Biomaterials*, 25(14), 2831-2841.
- Anseth, K.S., Bowman, C.N. y Brannon-Peppas, L. (1996). Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials*, 17, 1647-1657.
- Borzacchiello, A. y Ambrosio, L. (2009). Structure-property relationships in hydrogels. En Barbucci, R. (Ed.), *Hydrogels: Biological Properties and Applications* (9-20). Italia: Springer-Verlag.
- Brouwer, J., Leeuwen-Herberts, T. y Ruit, M.O. (1984). Determination of lysozyme in serum, urine, cerebrospinal fluid and feces by enzyme immunoassay. *Clinica Chimica Acta*, 142, 21-30.
- Carbonell, J.M., Sanz Martín, I., Santos, A., Pujol, A., Sanz-Moliner, J.D. y Nart, J. (2014). High-density polytetrafluoroethylene membranes in guided bone and tissue regeneration procedures: A literature review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 43(1), 75-84.
- Cen, L., Liu, W.E.I., Cui, L.E.I., Zhang, W., Cao, Y., People, R.S.W.L.S. y Tong, S.J. (2008). Collagen tissue engineering: Development of novel biomaterials. 63(5), 492-496.
- Colgrave, M.L., Allingham, P.G. y Jones, A. (2008). Hydroxyproline quantification for the estimation of collagen in tissue using multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1212(1-2), 150-153.
- Collins, M.N. y Birkinshaw, C. (2013). Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering-A review. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1262-1278.
- De Alvarenga, E.S. (2011). Characterization and properties of chitosan. En Elnashar, M. (Ed.), *Biotechnology of Biopolymers* (91-108). InTech.
- De la Paz, N., Fernández, M., López, O.D., Nogueira, A., García, C.M., Pérez, D., Tobella, J.L., Montes de Oca, Y. y Díaz, D. (2012). Optimización del proceso de obtención de quitosano derivada de la quitina de langosta. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 13(3), 103-116.

- De Marco, A., Neves Jardim, M.A., Modolo, F., Nunes, F.D. y Pugliesi Alves de Lima, L.A. (2012). Immunolocalization of bone morphogenetic protein 2 during the early healing events after guided bone regeneration. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, 113(4), 533-541.
- D'Errico, G., De Lellis, M., Mangiapia, G., Tedeschi, A., Ortona, O. y Fusco, S. (2008). Structural and mechanical properties of UV-photo-cross-linked poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels. *Biomacromolecules*, 9, 231-240.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A. y Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21, 703-714.
- Dimitriou, R., Mataliotakis, G.I., Calori, G.M. y Giannoudis, P.V. (2012). The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: Current experimental and clinical evidence. *BMC Medicine*, 10, 81.
- Dojindo Molecular Technologies, Inc. (2017). *Cell counting kit-8*. Consultado el 7 de Agosto de 2017, de <http://www.dojindo.com/store/p/456-Cell-Counting-Kit-8.html>
- Drury, J.L. y Mooney, D.J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 24, 4337-4351.
- Dung, S.Z., Tu, Y.K. y Lu, H.K. (2014). Soft tissue response to fenestration type defects in the gingiva treated with various barrier membranes for regeneration. *Journal of Dental Sciences*, 9(2), 136-143.
- Fairand, B. P. (2001). *Radiation Sterilization for Health Care Products: X-Ray, Gamma, and Electron Beam*. EUA: CRC Press LLC.
- Ghanaati, S. (2012). Non-cross-linked porcine-based collagen I-III membranes do not require high vascularization rates for their integration within the implantation bed: A paradigm shift. *Acta Biomaterialia*, 8(8), 3061-3072.
- González, D., Olmos, G., López, C., Calzavara, D. y Cabello, G. (2005). Membranas no reabsorbibles en implantología. Razonamiento para su uso e indicaciones. *Periodoncia y Osteointegración*, 15(5), 1-14.
- González, D., Terriza, A., Barranco, Á., Yubero, F., Díaz, A. y Rodríguez, A. (2014). Membrana reabsorbible para regeneración ósea guiada.
- Han, C.M., Zhang, L.P., Sun, J.Z., Shi, H.F., Zhou, J. y Gao, C.Y. (2010). Application of collagen-chitosan/fibrin glue asymmetric scaffolds in skin tissue engineering. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, 11(7), 524-530.
- He, Z. y Xiong, L. (2012). Evaluation of physical and biological properties of polyvinyl alcohol/chitosan blend films. *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics*, 51, 1705-1714.
- Hernández, H., Águila, E., Flores, O., Viveros, E.L. y Ramos, E. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y Vacío*, 22(3), 57-60.

- Hidalgo, C., Suárez, Y. y Fernández, M. (2008). Validación de una técnica potenciométrica para determinar el grado de desacetilación de la quitosana. *Ars Pharmaceutica*, 49(3), 245-257.
- Hidalgo, J.L. (2015). Síntesis de esferas de quitosán y quitosán-TiO₂ impresas molecularmente para la adsorción de Hg(II) y la degradación fotocatalítica del rojo de metilo como una alternativa en el tratamiento de aguas residuales (Tesis de licenciatura). FES Cuautitlán, UNAM, Edo. Méx., México.
- Hidalgo, J.L. y Miranda, S.P. (2013). *Caracterización del quitosán: grado de desacetilación y peso molecular*. (Manual). Cuautitlán Izcalli: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hua, J., Li, Z., Xia, W., Yang, N., Gong, J., Zhang, J. y Qiao, C. (2016). Preparation and properties of EDC/NHS mediated crosslinking poly (gamma-glutamic acid)/epsilon-polylysine hydrogels. *Elsevier B.V.*
- Ignat'eva, N.Y., Danilov, N.A., Averkiev, S.V., Obrezkova, M.V., Lunin, V.V., y Sobol', E.N. (2007). Determination of hydroxyproline in tissues and the evaluation of the collagen content of the tissues. *Journal of Analytical Chemistry*, 62, 51-57.
- Jeon, O., Song, S.J., Lee, K.J., Park, M.H., Lee, S.H. y Hahn, S.K. (2007). Mechanical properties and degradation behaviors of hyaluronic acid hydrogels cross-linked at various cross-linking densities. *Carbohydrate Polymers*, 70, 251-257.
- Ji, W., Yang, F., Ma, J., Bouma, M.J., Boerman, O.C. y Chen, Z. (2013). Incorporation of stromal cell-derived factor-1 α in PCL/gelatin electrospun membranes for guided bone regeneration. *Biomaterials*, 34(3), 735-745.
- Jithendra, P., Rajam, A.M., Kalaivani, T., Mandal, A.B. y Rose, C. (2013). Preparation and characterization of aloe vera blended collagen-chitosan composite scaffold for tissue engineering applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5, 7291-7298.
- Kasaai, M.R. (2007). Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydrate Polymers*, 68, 477-488.
- Kazakos, K., Lyras, D.N., Thomaidis, V., Agrogiannis, G., Botaitis, S. y Drosos, G. (2011). Application of PRP gel alone or in combination with guided bone regeneration does not enhance bone healing process: An experimental study in rabbits. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 39(1), 49-53.
- Kharaziha, M., Fathi, M.H. y Edris, H. (2013). Development of novel aligned nanofibrous composite membranes for guided bone regeneration. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 24, 9-20.
- Ko, I.K., Lee, S.J., Atala, A. y Yoo, J.J. (2013). *In situ* tissue regeneration through host stem cell recruitment. *Experimental & Molecular Medicine*, 45, 57.

- Krishnamoorthy, G., Selvakumar, R., Parvathaleswara, T., Sadulla, S., Baran, A. y Doble, M. (2014). Experimental and theoretical studies on Gallic acid assisted EDC/NHS initiated crosslinked collagen scaffolds. *Materials Science Engineering C*, 43, 164-171.
- Krotzsch, F.E. (1992). Método modificado para extracción de colágena nativa a partir de piel de ovino no-nato (Tesis de licenciatura). Facultad de Química, UNAM, Cd. Mx., México.
- Lárez, C. (2003). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 4(2), 91-109.
- Lee, K.Y. y Mooney, D.J. (2001). Hydrogels for tissue engineering. *Chemical Reviews*, 101, 1869-1879.
- Li, J. (2004). Polymeric hydrogels. En Hin, T.S. (Ed.), *Engineering Materials for Biomedical Applications* (7-18). Reino Unido: World Scientific Publishing Co.
- Li, W., Guo, R., Lan, Y., Zhang, Y., Xue, W. y Zhang, Y. (2013). Preparation and properties of cellulose nanocrystals reinforced collagen composite films. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102, 1131-1139.
- Li, W., Long, Y., Liu, Y., Long, K., Liu, S., Wang, Z., Wang, Y. y Ren, L. (2014). Fabrication and characterization of chitosan-collagen crosslinked membranes for corneal tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25(17), 1962-1972.
- Li, X., Chen, S.I., Zhu, S.X. y Zha, G.Q. (2012). Guided bone regeneration using collagen membranes for sinus augmentation. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 50(1), 69-73.
- Liu, Y., Vrana, N.E., Cahill, P.A. y McGuinness, G.B. (2009). Physically crosslinked composite hydrogels of PVA with natural macromolecules: Structure, mechanical properties, and endothelial cell compatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials*, 90, 492-502.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H. y Matsudaira, P. (2007). *Molecular Cell Biology* (6a Ed.). EUA: W.H. Freeman and Company.
- Madhavan, K., Belchenko, D., Motta, A. y Tan, W. (2010). Evaluation of composition and crosslinking effects on collagen-based composite constructs. *Acta Biomaterialia*, 6(4), 1413-1422.
- Mamalis, A.A. y Cochran, D.L. (2011). The therapeutic potential of oxygen tension manipulation via hypoxia inducible factors and mimicking agents in guided bone regeneration. A review. *Archives of Oral Biology*, 56(12), 1466-1475.
- Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., Aiello, C., Chandler, C. y Gutiérrez, E. (2011). Quitina y quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU*, 53-58.

- Mathews, D.T., Birney, Y.A., Cahill, P.A. y McGuinness, G.B. (2008). Mechanical and morphological characteristics of poly(vinyl alcohol)/chitosan hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science*, 109, 1129-1137.
- Maver, T., Maver, U., Kleinschek, K.S., Rascan, I.M. y Smrke, D.M. (2015). Advanced therapies of skin injuries. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 127, 187-198.
- McKenzie, J.L. y Webster, T. (2009). Protein interactions at material surface. En Narayan, R. (Ed.), *Biomedical Materials* (215-238). EUA: Springer Science.
- Miller, E.J. y Rhodes, R.K. (1982). Preparation and characterization of the different types of collagen. En Cunningham, L. y Fredericksen, D. (Ed.), *Methods in Enzymology* 82 (33-64). EUA: Academic Press.
- Miranda, S.P. (2000). Proceso para la extracción de quitina a partir de crustáceos y su conversión a quitosán. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, México, No. de patente 293022, No. de expediente 005444, No. de folio 1175930-5.
- Muzzarelli, R.A.A. y Muzzarelli, C. (2005). Chitosan chemistry: relevance to the biomedical sciences. *Advances in Polymer Science*, 186, 151-209.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W. y Kishimura, H. (2007). Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 104(2), 593-601.
- Nam, K., Kimura, T. y Kishida, A. (2007). Physical and biological properties of collagen-phospholipid polymer hybrid gels. *Biomaterials*, 28(20), 3153-3162.
- Nandagiri, V.K. (2013). Biomaterials of natural origin in regenerative medicine. En Dumitriu, S. y Popa, V. (Ed.), *Polymeric Biomaterials: Structure and Function* (271-308). EUA: CRC Press.
- Narayan, R. (2009). *Biomedical Materials*. EUA: Springer.
- Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry* (4a ed.). EUA: W.H. Freeman.
- O'Brien, F.J. (2011). Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88-95.
- Olteanu, C.E. y Enescu, D. (2007). Chitosan involved tissue engineering and regenerative medicine. *Romanian Biotechnology*, 12, 3217-3233.
- Omidian, H. y Park, K. (2010). Introduction to hydrogels. En Ottenbrite, R.M. (Ed.), *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook* (1-16). EUA: Springer Science.
- Pinto, P., Yoshimoto, M., Simão, R., Munir, S., Siqueira, J.T.T. y Alves, M.A.V. (2011). Guided bone regeneration with polypropylene membrane-Histological analysis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 40(10), 1138.
- Porstmann, B., Jung, K., Schmechta, H., Evers, U., Pergande, M., Porstmann, T., Kramm, H.J. y Krause, H. (1989). Measurement of lysozyme in human body fluids: Comparison of various enzyme immunoassay techniques and their diagnostic application. *Clinical Biochemistry*, 22, 349-355.

- Rakhmatia, Y.D., Ayukawa, Y., Furuhashi, A. y Koyano, K. (2013). Current barrier membranes: Titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *Journal of Prosthodontic Research*, 57(1), 3-14.
- Ramshaw, J.A.M., Peng, Y.Y., Glattauer, V. y Werkmeister, J.A. (2009). Collagens as biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20.
- Robyt, J.F. y White, B.J. (1987). *Biochemical Techniques: Theory and Practice*. Waveland Press.
- Shabafrooz, V., Mozafari, M., Köhler, G., Assefa, S., Vashae, D. y Tayebi L. (2013). The effect of hyaluronic acid on biofunctionality of gelatin-collagen intestine tissue engineering scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*.
- Shanmugasundaram, N., Ravichandran, P., Reddy, P.N., Ramamurty, N., Pal, S. y Rao, K.P. (2001). Collagen-chitosan polymeric scaffolds for the *in vitro* culture of human epidermoid carcinoma cells. *Biomaterials*, 22(14), 1943-1951.
- Shoulders, M.D. y Raines, R.T. (2010). Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*, 929-958.
- Sionkowska, A. (2013). Natural polymers as components of blends for biomedical applications. En Dumitriu, S. y Popa, V. (Ed.), *Polymeric Biomaterials: Structure and Function* (309-340). EUA: CRC Press.
- Song, J.Y., Kim, S.G., Lee, J.W., Chae, W.S., Kweon, H.Y. y Jo, Y.Y. (2011). Accelerated healing with the use of a silk fibroin membrane for the guided bone regeneration technique. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, 112(6), 26-33.
- Suyatma, N.E., Copinet, A., Legin, E., Fricoteaux, F. y Coma, V. (2011). Different PLA grafting techniques on chitosan. *Journal of Polymers and the Environment*, 19, 166-171.
- Tangsadthakun, C., Kanokpanont, S., Sanchavanakit, N., Banaprasert, T. y Damrongsakkul, S. (2006). Properties of collagen/chitosan scaffolds for skin tissue engineering. *Journal of Metals, Materials and Minerals*, 16, 37-44.
- Thermo Scientific. (2017). EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride). Consultado el 7 de Agosto de 2017, de <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/22980>
- Treloar, L.R.G. (2005). *The Physics of Rubber Elasticity*. EUA: Oxford University Press.
- Ungureanu, C., Ioniță, D., Berteanu, E., Tcacenco, L., Zuav, A. y Demetrescu, I. (2015). Improving natural biopolymeric membranes based on chitosan and collagen for biomedical applications introducing silver. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26(3), 458-465.
- Vázquez, T.V.F., Vázquez, A. y Fournier, S. (2010). Estudios histológicos y bioquímicos de la piel envejecida. En Catelo-Branco, C. (Ed.), *El Envejecimiento de la Piel y las Mucosas* (136). Argentina; España: Médica Panamericana.

- Wang, X.H., Li, D.P., Wang, W.J., Feng, Q.L., Cui, F.Z., Xu, Y.X., Song, X.H. y Werf, M. (2003). Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. *Biomaterials*, 24, 3213-3220.
- Woessner, J.F. (1961). The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 93, 440-447.
- Yang, J.W., Park, H.J., Yoo, K.H., Chung, K., Jung, S. y Oh, H.K. (2014). A comparison study between periosteum and resorbable collagen membrane on iliac block bone graft resorption in the rabbit calvarium. *Head & Face Medicine*, 10(1), 15.
- Zamora, V., Sibaja, M. y Vega, J. (2010). Diseño de un biofilm a partir de colágeno de pieles de tilapia y de quitosano de camarón como soporte para aplicaciones en ingeniería de tejidos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 11(7), 607-619.
- Zhang, F., He, C., Cao, L., Feng, W., Wang, H., Xo, X., y Wang, J. (2011). Fabrication of gelatin-hyaluronic acid hybrid scaffolds with tunable porous structures for soft tissue engineering. 48, 474-481.
- Zhang, Q., Liu, L., Ren, L. y Wang, F. (1996). Preparation and characterization of collagen-chitosan composites. 2127-2130.
- Zhong, S.P., Zhang, Y.Z. y Lim, C.T. (2010). Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology*, 2(5), 510-525.

8. Apéndice

8.1. Preparación de Disoluciones

8.1.1. Cuantificación de la Colágena Tipo I

Buffer de citratos

Se disolvieron 0.5 g de ácido cítrico en 0.12 mL de HAc. Después se adicionaron 1.2 g de NaAc, 0.34 g de NaOH, 5 mL de agua desionizada y se agitó. Por último, se ajustó el pH a 6 (empleando NaOH y HCl) y se aforó a 10 mL con agua desionizada.

Cloramina T

Se disolvieron 141 mg de cloramina T en 2 mL de agua desionizada. Después se adicionaron 3 mL de 2-metoxietanol y se agitó. Por último, se aforó a 10 mL con el buffer de citratos. Nota: Una vez preparada la disolución, utilizarla antes de que pasen más de 15 min.

4-(Dimetilamino)benzaldehído

Se disolvieron 2 g de 4-(dimetilamino)benzaldehído en 5 mL de 2-metoxietanol calentando ligeramente. Después se dejó enfriar y se aforó a 10 mL con 2-metoxietanol. Nota: Una vez preparada la disolución, utilizarla antes de que pasen más de 15 min.

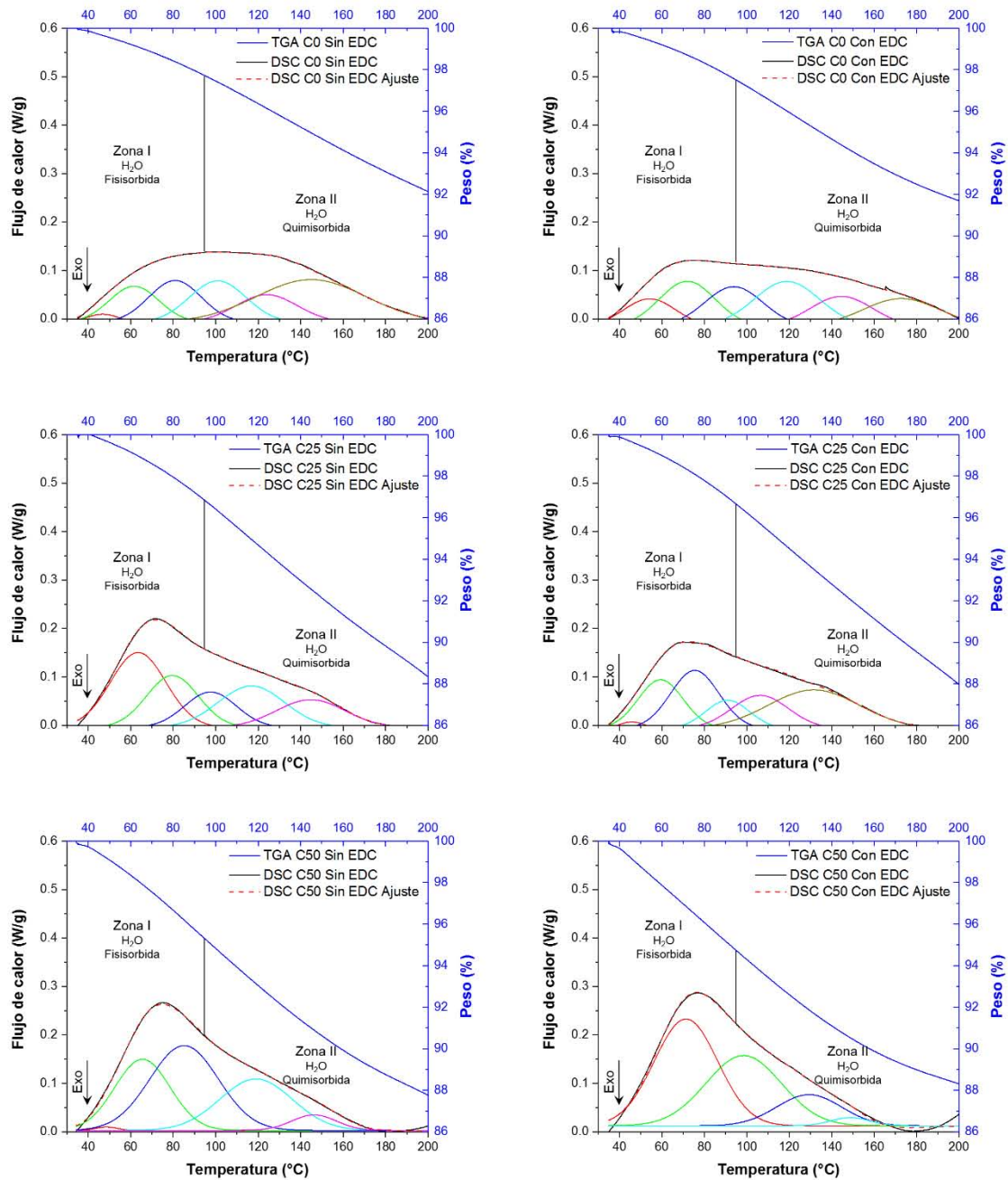
8.1.2. Electroforesis de la Colágena Tipo I

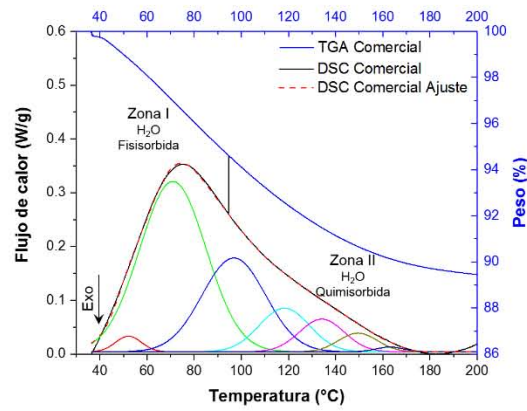
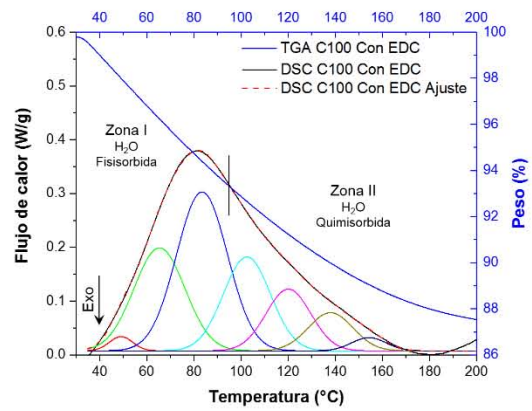
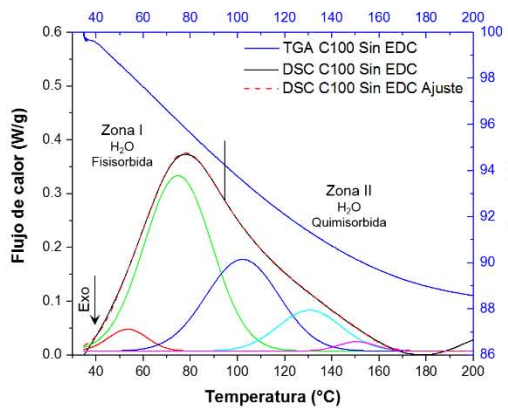
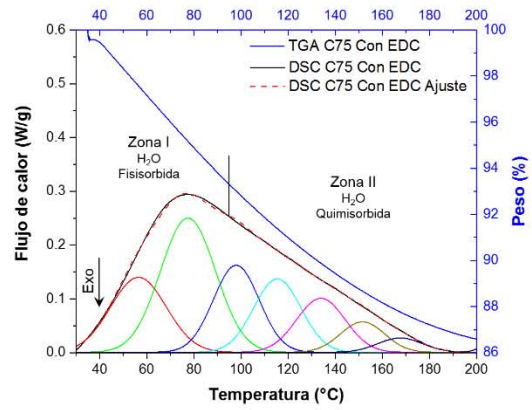
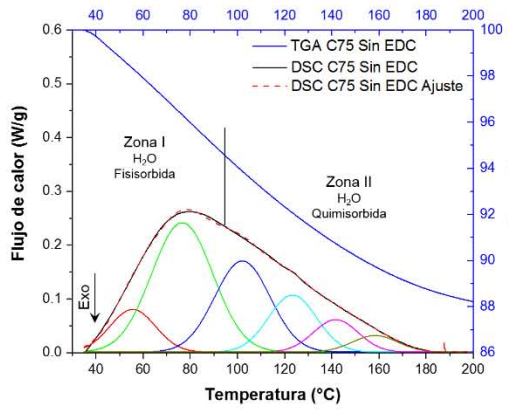
Gel de poliacrilamida

Gel separador 7 %	Gel concentrador 4 %
Agua desionizada	Agua desionizada
Acrilamida/bis-acrilamida	Acrilamida/bis-acrilamida
Tris 1.5 M pH 8.8	Tris 0.5 M pH 6.8
SDS 10 %	SDS 10 %
APS 10 %	APS 10 %
TEMED	TEMED

8.2. Análisis Térmico

8.2.1. Termogramas de TGA y DSC de las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento; y de la membrana comercial.





8.2.2. Porcentaje de pérdida de peso de las membranas de colágena-quitosán y de sus componentes puros sin y con entrecruzamiento; y de la membrana comercial.

Membrana	Peso perdido (%)					
	Agua fisisorbida		Agua quimisorbida		Agua total	
	Sin EDC	Con EDC	Sin EDC	Con EDC	Sin EDC	Con EDC
C0	2.3	2.6	5.6	5.8	7.9	8.4
C25	3.1	3.3	8.5	8.7	11.7	12.0
C50	4.7	5.2	7.6	6.5	12.2	11.7
C75	5.4	6.7	6.4	6.8	11.8	13.4
C100	5.8	6.6	5.7	5.8	11.4	12.5
Comercial	5.4		5.2		10.6	

8.3. Técnicas Analíticas

A continuación se presentan los principios en los que se basan algunas técnicas analíticas haciendo hincapié en los métodos específicos empleados en este trabajo.

8.3.1. Espectrometría UV-visible (UV-vis)

La espectrometría UV-visible es una técnica que permite identificar compuestos químicos y determinar su concentración en muestras a través de la absorción y transmisión selectiva de la región visible y ultravioleta del espectro electromagnético (Atkins y Jones, 2006).

La región visible abarca el intervalo de longitudes de onda que el ojo humano es capaz de percibir como colores. Es la región comprendida entre 350-800 nm. El orden de los colores de mayor a menor longitud es: rojo > naranja > amarillo > verde > azul > violeta. La región ultravioleta abarca el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 100-200 nm y se divide en dos regiones diferentes: la región de ultravioleta lejano que se extiende desde 100 a 200 nm y la región de ultravioleta cercano que va desde 200 a 350 nm. Por lo tanto, la radiación ultravioleta es más energética que la visible (a menor longitud de onda, mayor energía) (Silva y García, 2006; Abburra, 2007).

Cuando la radiación de estas longitudes de onda incide sobre una molécula, ésta porta suficiente energía para excitar a los electrones de la molécula llevándolos a una distribución diferente. Por lo tanto, el estudio de los espectros de absorción obtenidos nos

da información acerca del tipo de conjugación que existe en la molécula (Atkins y Jones, 2006).

Para que una molécula sea capaz de absorber en la región visible y ultravioleta ha de tener grupos cromóforos. Los cromóforos son grupos funcionales que contienen dobles o triples enlaces, dobles enlaces conjugados, entre otros. Otros grupos que contribuyen a las características de absorción de una molécula son los auxocromos. Un auxocromo es un grupo funcional que por sí no absorbe pero que presenta la capacidad de modificar la absorción del cromóforo al que esté unido (Silva y García, 2006).

Si representamos la absorbancia a varias longitudes de onda obtendremos una curva característica de cada compuesto químico que se denomina espectro de absorción. Este espectro se puede ver modificado por los auxocromos, el pH, la concentración, entre otros (Silva y García, 2006). El espectro puede ayudarnos a evaluar cuantitativamente la absorción y a efectuar un análisis preciso del poder de captación de energía de la molécula. El espectro de absorción visible y ultravioleta se mide en un espectrofotómetro de absorción (Atkins y Jones, 2006).

8.3.2. Espectroscopía de Infrarrojo (IR)

La espectroscopía de infrarrojo es una técnica de análisis que permite identificar los grupos de átomos presentes en una molécula a partir de la naturaleza de los átomos y las uniones que los constituyen. Cuando una molécula recibe radiaciones infrarrojas, absorbe energía, lo que aumenta las vibraciones atómicas y libera luego energía en forma de calor (Buquet, 2006). Puesto que los diferentes enlaces y grupos funcionales absorben energía a distintas frecuencias, los espectros emitidos en el infrarrojo pueden presentar muchas bandas de absorción características asociadas con varios grupos de átomos (Bailey y Bailey, 1998; Buquet, 2006; Atkins y Jones, 2006). La región de bandas de absorción del espectro puede ser muy difícil de analizar en detalle, pero su presencia nos permite reconocer a la sustancia comparando su espectro con los de una biblioteca de espectros (Atkins y Jones, 2006).

Cualquier enlace entre dos átomos vibra a medida que los átomos se acercan y se alejan uno del otro. Este tipo de movimiento se llama vibración longitudinal. Las moléculas poliatómicas pueden sufrir además vibraciones de flexión (tijereteo, balanceo, coleo o torsión) en las cuales los ángulos entre los enlaces periódicamente aumentan y

disminuyen (Figura 50). La frecuencia a la cual las moléculas vibran depende de las masas de sus átomos y de la fuerza de unión: una molécula formada por átomos livianos unidos por enlaces rígidos tiene una frecuencia vibracional más alta que una formada por átomos pesados unidos por enlaces más débiles. La primera absorberá entonces radiaciones de frecuencias más altas que esta última. Los movimientos de flexión de las moléculas tienden a ser menos fuertes que los movimientos longitudinales, por lo tanto, las vibraciones de flexión absorben típicamente radiación de frecuencias más bajas que las vibraciones longitudinales (Atkins y Jones, 2006).

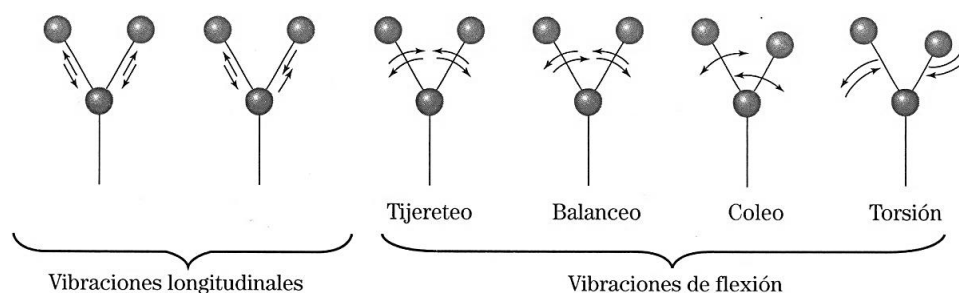


Figura 50. Vibraciones moleculares causadas por radiación infrarroja. Generalmente, las vibraciones longitudinales absorben radiación de frecuencias más altas que las vibraciones de flexión (Atkins y Jones, 2006).

En la práctica, el espectro de absorción vibracional de una molécula se mide utilizando un espectrómetro de infrarrojo (Atkins y Jones, 2006). Un espectrómetro de infrarrojo somete la muestra a radiación infrarroja en la banda de longitudes de onda (λ) de 2 a 15 micrómetros (μm). Esta región se describe más a menudo en términos de número de onda (frecuencia), $5,000$ a 670 cm^{-1} , que es fundamentalmente el número de ciclos u ondas en una distancia de un centímetro, calculado como $1/\lambda$, con λ en centímetros (Bailey y Bailey, 1998). Existen dos tipos de espectrómetros: el Infrarrojo de Difracción (D-IR) de haz simple o de doble haz y el Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) (Martín *et al.*, 2012).

Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier es una técnica que permite detectar y medir todas las longitudes de onda de la región infrarroja simultáneamente. Esta simultaneidad es una de las razones por las que, actualmente, el FT-IR es preferible frente al D-IR. Un FT-IR posee tres componentes fundamentales: fuente de radiación, interferómetro de Michelson y detector. El interferómetro de Michelson (componente característico de los espectrómetros FT-IR) está constituido por un espejo móvil, un

espejo fijo y un divisor de rayos. Éste es un espejo que permite que parte de la radiación que incide sobre él se transmita y parte se refleje. Según un esquema de un FT-IR, la radiación procedente de la fuente se divide en dos rayos, que se encuentran en el detector tras haber recorrido diferentes trayectorias. A partir de la señal del detector se obtiene un interferograma (registro de la señal que produce un interferómetro de Michelson). La transformada de Fourier es simplemente un cálculo matemático que convierte el interferograma en un espectro IR. Concretamente, la transformada de Fourier permite obtener una señal dependiente del número de onda a partir de una señal dependiente del tiempo. Entre las principales ventajas que el FT-IR ofrece con respecto al D-IR, se pueden destacar las siguientes características: alta velocidad, resolución, sensibilidad, exactitud y precisión (Martín *et al.*, 2012).

8.3.3. Análisis Termogravimétrico (TGA)

En un análisis termogravimétrico se registra continuamente la masa de una muestra colocada en una atmósfera controlada en función de la temperatura o del tiempo en que aumenta su temperatura (por lo general, en forma lineal con el tiempo). La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo se denomina *termograma* o *curva de descomposición térmica*.

Los instrumentos comerciales modernos empleados en termogravimetría constan de 1) una microbalanza sensible, también llamada termobalanza; 2) un horno, 3) un sistema de gas de purga para proporcionar una atmósfera inerte o, algunas veces, reactiva y 4) un sistema computarizado para el control del instrumento y la adquisición y el proceso de los datos. Además, existe la opción común de añadir un sistema para sustituir el gas de purga en aquellos casos en los que este gas se tiene que cambiar durante el experimento.

Balanza térmica

Se pueden encontrar en el comercio diferentes diseños de termobalanzas o balanzas térmicas que tienen la capacidad de proporcionar información cuantitativa sobre muestras cuyas masas van desde 1 mg hasta 100 g. Sin embargo, el tipo de balanza más común acepta sólo masas entre 1 y 100 mg. Muchas de las balanzas son capaces de detectar cambios en la masa de hasta 0.1 µg. Si bien el soporte de la muestra debe estar alojado en el horno, el resto de la balanza debe estar aislado térmicamente de aquél. La Figura 51 muestra el esquema de un diseño de una termobalanza. Un cambio en la masa de la muestra causa una desviación del brazo, que interpone un obturador luminoso entre una

lámpara y uno de dos fotodiodos. El desequilibrio resultante en la corriente fotodiódica se amplifica y alimenta la bobina *E*, que está situada entre los polos de un imán permanente *F*. El campo magnético generado por la corriente en la bobina devuelve al brazo su posición original. La corriente amplificada del fotodiodo se verifica y transforma en información sobre la masa o la pérdida de ella en el sistema de adquisición de datos. En la mayoría de los casos, los datos de masa frente a temperatura se representan en tiempo real o se almacenan para trabajar con ellos y desplegarlos después (Skoog *et al.*, 2008).

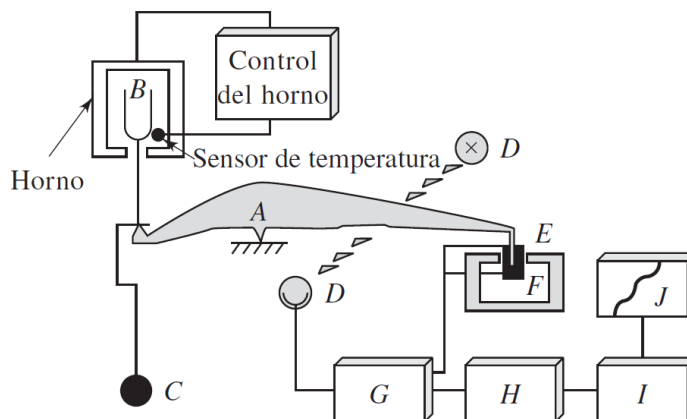


Figura 51. Componentes de una termobalanza. El brazo de la balanza es *A*, *B* es la copa y el portamuestra; *C* es un contrapeso, *D* es la lámpara y los fotodiodos, *E* es una bobina magnética y *F* es un imán permanente. Los sistemas de adquisición de datos, de proceso de datos y de control de la computadora son *G*, *H* e *I*. El componente *J* es la impresora y la pantalla (Skoog *et al.*, 2008).

Horno

El intervalo de temperatura para la mayoría de los hornos para termogravimetría va desde la temperatura ambiente hasta 1000 °C, aunque algunos se usan con temperatura de hasta 1600 °C. A menudo, las tasas de calentamiento se pueden seleccionar desde 0.1 °C/min hasta 100 °C/min. Algunos hornos se pueden calentar a 200 °C/min. Para evitar la transferencia de calor a la balanza es necesario aislar y refrigerar el exterior del horno. Por lo regular se utiliza nitrógeno o argón para purgar el horno y evitar la oxidación de la muestra. En algunos análisis es necesario cambiar los gases de purga a lo largo del proceso.

El eje de la temperatura se calibra mediante un material cuyo punto Curie se conoce o se emplea un patrón de punto de fusión. El *punto Curie* es la temperatura a la cual un material ferromagnético se vuelve paramagnético. El material ferromagnético se suspende en un campo magnético orientado de tal manera que un componente vertical de la fuerza

magnética actúa sobre la muestra. La fuerza magnética actúa como una masa magnética equivalente sobre el brazo de la balanza termogravimétrica para indicar una masa aparente de la muestra. Cuando la muestra se calienta y se deja que alcance su punto Curie, se pierde la masa magnética y la balanza indica una pérdida aparente de masa. La exactitud de la temperatura es mejor que 1 °C en la mayoría de los hornos y la precisión de la temperatura es casi siempre ± 0.1 °C. Por lo regular, los hornos se enfrían mediante aire forzado. La mayoría de los hornos se puede enfriar desde 1000 a 50 °C en menos de 20 min.

Portamuestras

Por lo general, las muestras se colocan en recipientes hechos de platino, aluminio o alúmina. El platino se usa más porque es inerte y fácil de limpiar. Los volúmenes de los recipientes para la muestra varían de 40 μL a más de 500 μL . Hay accesorios tomadores de muestra automáticos para la mayoría de los sistemas termogravimétricos. En la mayoría de estas unidades, todos los aspectos son automáticos con ayuda de un programa de control. La tara del recipiente de la muestra, la carga y el peso; el calentamiento y el enfriamiento del horno, y la descarga del recipiente son completamente automáticos.

Aplicaciones

Puesto que el análisis termogravimétrico verifica la masa del analito con ayuda de la temperatura, la información que proporciona es cuantitativa, pero limitada a las reacciones de descomposición y de oxidación, y a procesos como vaporización, sublimación y desorción. Entre las aplicaciones más importantes del análisis termogravimétrico están el análisis de composición y los perfiles de descomposición de sistemas con múltiples componentes.

En los estudios sobre polímeros, los termogramas proporcionan información sobre los mecanismos de descomposición de diversas preparaciones poliméricas. Además, los patrones de descomposición son característicos de cada tipo de polímero y, en algunos casos, pueden utilizarse con fines de identificación.

La Figura 52 ilustra cómo se puede usar un termograma para analizar la composición de un material polimérico. La muestra es un polietileno que ha sido contaminado con

partículas finas de carbón para inhibir la degradación ocasionada por la exposición a la luz solar (Skoog *et al.*, 2008).

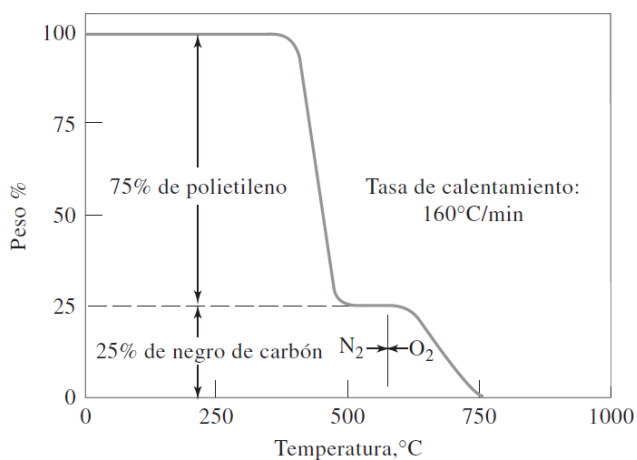


Figura 52. Determinación termogravimétrica de negro de carbón en polietileno (Skoog *et al.*, 2008).

8.3.4. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Éste es el método de análisis térmico más usado, sobre todo por su rapidez, sencillez y disponibilidad. En la calorimetría diferencial de barrido, la muestra y la referencia se colocan en recipientes especiales en el instrumento. Los calentadores suben la temperatura a una tasa específica, o bien, mantienen la calorimetría diferencial de barrido a una temperatura determinada. El instrumento mide la diferencia en el flujo de calor entre la muestra y la referencia.

En esta técnica se mide la diferencia en el flujo de calor en la muestra y en la referencia mientras la temperatura de la muestra cambia a un ritmo constante. Tanto la muestra como la referencia se calientan con una misma unidad calefactora. El calor fluye tanto hacia la muestra como hacia el material de referencia a través de un disco termoeléctrico de constantán⁴ calentado eléctricamente, como se puede ver en la Figura 53. Los platillos pequeños de aluminio para la muestra y la referencia se colocan sobre plataformas elevadas formadas en el disco de constantán. El calor se transfiere a través de los discos hacia los materiales por medio de los dos platillos. El flujo de calor diferencial de la muestra y de la referencia se controla mediante unos termopares de superficie de Chromel⁵-constantán formados por la unión entre la plataforma de constantán y los discos

⁴El constantán es una aleación con 60 % de cobre y 40 % de níquel (Skoog *et al.*, 2008).

⁵El Chromel es una marca registrada para una serie de aleaciones que contienen cromo, níquel y, algunas veces, hierro.

de Chromel unidos a la parte inferior de la plataforma. La diferencia entre la cantidad de calor que fluye hacia los dos platillos es directamente proporcional a la diferencia en las salidas de las dos uniones del termopar. La temperatura de la muestra se calcula por la unión de Chromel-alumel⁶ colocada debajo del disco de la muestra (Skoog *et al.*, 2008).

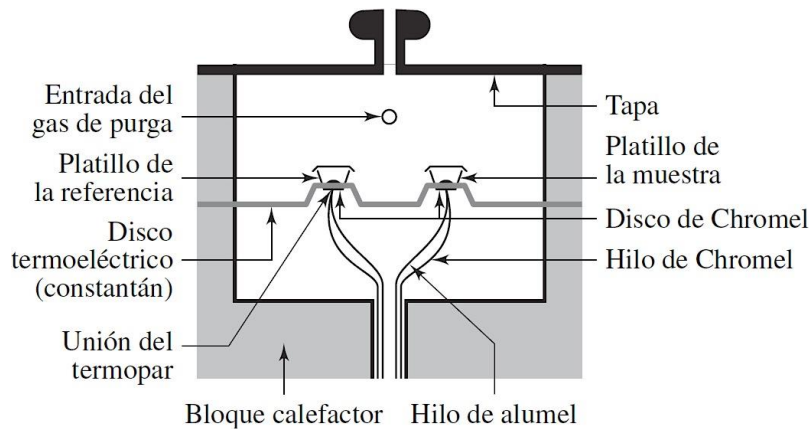


Figura 53. Calorimetría diferencial de barrido de flujo de calor (Skoog *et al.*, 2008).

En la Figura 54 se ilustra un termograma típico de calorimetría diferencial de barrido. En la gráfica se ven varios procesos que ocurren cuando cambia la temperatura. Un incremento en el flujo de calor evidencia un proceso exotérmico y una disminución indica un proceso endotérmico.

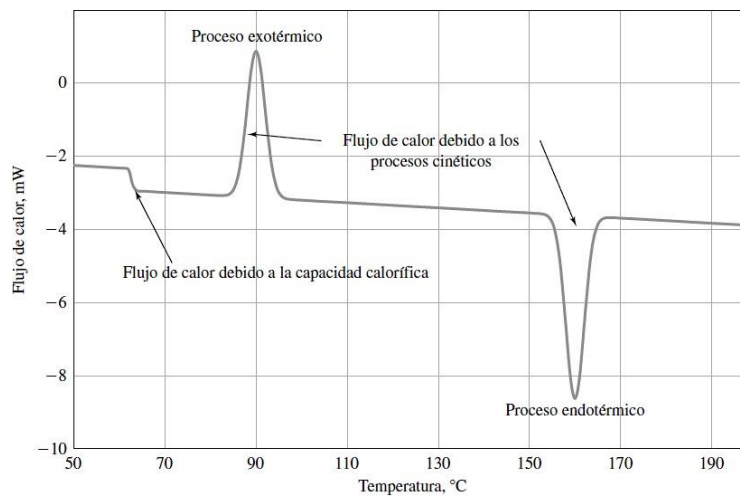


Figura 54. Barrido con DSC característico para un material polimérico. Hay un fenómeno exotérmico a casi 90°C y uno endotérmico a 160°C (Skoog *et al.*, 2008).

⁶El alumel es una aleación de níquel con 2 % de aluminio, 2 % de manganeso y 1 % de silicio (Skoog *et al.*, 2008).

Un experimento característico de DSC inicia con la determinación del peso de un platillo vacío para la muestra. Los platillos casi siempre están hechos de aluminio, pero también se utiliza oro, acero inoxidable y ampollas de vidrio. A menudo se usan platillos herméticos. Luego se transfiere una pequeña cantidad de la muestra de tal manera que quede una capa uniforme en el fondo del recipiente. Este recipiente se sella en forma hermética y luego se pesa de nuevo. Cuando los recipientes de la muestra y de la referencia ya están en su posición, se aplica el gas de purga. Algunos instrumentos están equipados con muestreadores automáticos, con los que se pueden tener múltiples recipientes para muestras en un soporte para ser sometidos a estudio en forma sucesiva. Los gases de purga más comunes son el helio o el nitrógeno, pero a veces se utiliza aire u oxígeno para estudiar los procesos de oxidación. El gas de purga ayuda a extraer la humedad y el oxígeno de la muestra y favorece la transferencia de calor al recipiente de la misma.

Los instrumentos modernos de calorimetría diferencial de barrido están controlados mediante una computadora de modo que el experimento se efectúa en forma automática luego de que el usuario indica los parámetros, como el programa de temperatura y los diversos valores de calibración.

La calorimetría diferencial de barrido tiene muchas aplicaciones para determinar las características de los materiales. Entre las aplicaciones cuantitativas están la determinación de los calores de fusión y el grado de cristalización de materiales cristalinos. Las temperaturas de transición vítrea y los puntos de fusión son útiles en la clasificación cualitativa de materiales, aunque los métodos térmicos no se pueden usar solos para la identificación. Asimismo, los puntos de fusión son muy útiles para establecer la pureza de varias preparaciones. Por lo tanto, los métodos térmicos se aplican a menudo en el control de calidad (Skoog *et al.*, 2008).

8.3.5. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido constituye un método esencial para el estudio de la morfología y composición química de las muestras con una resolución alta y en un intervalo amplio de aumentos. Dicha técnica se basa en la interacción de un haz de electrones (e^-) y la superficie de la muestra. El haz realiza un barrido sobre la superficie y origina, al incidir en la misma, la emisión de diferentes señales (e^- secundarios y reflejados; rayos X; fotones, entre otras.) que son captadas por distintos detectores,

dando lugar a señales eléctricas que son ampliadas y más tarde transmitidas a un monitor (Gómez y Campos, 2009).

Los e^- secundarios son electrones de baja energía originados por colisiones inelásticas y se usan como señal para el estudio tridimensional de la superficie de la muestra. Los e^- reflejados son electrones del haz primario que salen de la superficie de la muestra sin una significativa pérdida de energía por colisiones elásticas. Los rayos X pueden ser analizados para determinar la presencia cualitativa y/o cuantitativa de los elementos químicos de la muestra. Cada señal obtenida del SEM es captada con un detector apropiado (Hernández y Espejo, 2002).

Los componentes básicos del SEM son los siguientes (Hernández y Espejo, 2002):

- a) Cañón de electrones que produce un haz con energía entre 5 y 30 kV con un diámetro efectivo entre 0.1 y 10 μm .
- b) Lentes electromagnéticas condensadoras que reducen el diámetro del haz, de manera que en la superficie de la muestra se tiene un diámetro apropiado al aumento de la imagen.
- c) Lentes magnéticas del objetivo que enfocan el haz en la superficie de la muestra.
- d) Sistema de barrido que permite la construcción de la imagen en el monitor por el barrido del haz en la superficie de la muestra.
- e) Detectores de señales emitidas por la muestra (e^- secundarios y reflejados; rayos X; fotones; entre otras.).

Referencias del Apéndice

- Abburra, R. (2007). *Evaluación y Control de los Impactos Generados por Sustancias y Residuos No Convencionales*. España: Brujas.
- Atkins, P. y Jones, L. (2006). *Principios de Química: Los Caminos del Descubrimiento* (3a ed.). Argentina: Médica Panamericana.
- Bailey, P.S. y Bailey, C.A. (1998). *Química Orgánica. Conceptos y Aplicaciones* (5a ed.). México: Prentice Hall Hispanoamericana.
- Buquet, A. (2006). *Manual de Criminalística Moderna: La Ciencia y la Investigación de la Prueba*. México; Argentina; España: Siglo XXI.
- Gómez, M.E. y Campos A. (2009). *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental* (3a ed.). México: Médica Panamericana.
- Hernández, H. y Espejo, E. (2002). *Mecánica de Fractura y Análisis de Falla*. Colombia: Colección Sede.

- Martín, B., Nicolás, M.J. y López, B. (2012). Espectrometría de absorción en el infrarrojo por transformada de Fourier. *Reduca*, 4(10), 53.
- Silva, M.C. y García, M.J. (2006). *Técnico Especialista en Laboratorio de Atención Primaria del instituto Catalán de la Salud*. España: Mad.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. y Crouch, S.R. (2008). *Principios de Análisis Instrumental* (6a ed.). México: Cengage Learning.