



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVO POLIURETANO-
UREA BASADO EN 2-AMINOETIL METACRILATO CLORHIDRATO
INJERTADO EN QUITOSANO POR POLIMERIZACIÓN INDUCIDA
POR RADIACIÓN GAMMA**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA

PRESENTA
ILIAN HAIDE SERRANO AGUILAR



MÉXICO, CDMX

2019



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: FEDERICO JESÚS JIMÉNEZ CRUZ

VOCAL: JOSÉ DE JESÚS GARCÍA VALDÉS

SECRETARIO: MAYKEL GONZÁLEZ TORRES

1.º SUPLENTE: JOAQUÍN PREZA DE LA VEGA

2.º SUPLENTE: MARTHA VERÓNICA ESCÁRCEGA BOBADILLA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES

ASESOR DEL TEMA

DR. MAYKEL GONZÁLEZ TORRES

SUPERVISORA TÉCNICA

DRA. ANA LEONOR RIVERA LÓPEZ

SUSTENTANTE

ILIAN HAIDE SERRANO AGUILAR

Índice.....	I
Índice de figuras.....	IV
Índice de tablas.....	VI
Abreviaturas.....	VII
Unidades.....	IX
Glosario.....	XI
1. Introducción.....	1
1.1 Modificación de polímeros.....	1
1.2 Copolímeros.....	2
1.3 Injerto inducido por radiación.....	3
1.3.1 Métodos de injerto inducido por radiación.....	3
1.3.2 Ventajas del injerto radioinducido.....	5
1.3.3 Factores que afectan el injerto.....	6
1.3.3.1 Polímero.....	6
1.3.3.2 Monómero.....	7
1.3.3.3 Disolvente.....	7
1.3.3.4 Radiación (dosis y tasa de dosis).....	7
1.3.3.5 Temperatura.....	8

1.3.3.6	Atmósfera	9
1.3.3.7	Inhibidores de la formación de homopolímero	9
1.4	Caracterización de materiales poliméricos.....	11
1.4.1	Técnicas espectroscópicas.....	11
1.4.1.1	Resonancia magnética nuclear.....	11
1.4.1.2	Espectroscopía infrarroja	12
1.4.2	Técnicas térmicas.....	13
1.4.2.1	Análisis termogravimétrico	13
1.4.2.2	Calorimetría diferencial de barrido	14
1.4.3	Microscopía electrónica de barrido	15
1.4.4	Microtomografía computarizada	15
1.4.5	Ensayo de viabilidad celular por el método de MTT	16
1.5	Quitina y quitosano	18
1.5.1	Generalidades	18
1.5.2	Aplicaciones.....	20
1.5.3	Aplicaciones en ingeniería de tejidos de poliuretanos basados en quitosano	24
2.	Objetivo	27
2.1	Objetivo general	27
3.	Desarrollo experimental.....	28

3.1 Síntesis de los materiales poliméricos	28
3.1.1 Síntesis de los copolímeros de injerto Q-g-AEMA y determinación del grado de injerto	28
3.1.2 Síntesis del poliuretano QMS2PU	29
3.2 Técnicas de caracterización	30
3.2.1 Análisis por RMN	30
3.2.2 Análisis por FTIR	30
3.2.3 Análisis térmico	30
3.2.4 Análisis por SEM	31
3.2.5 Análisis por micro-CT	31
3.3 Estudio de las propiedades de los andamios	32
3.3.1 Propiedades mecánicas	32
3.3.2 Porosidad	32
3.3.3 Viabilidad celular	32
4. Análisis de Resultados	34
5. Conclusiones.....	53
6. Anexos	54
7. Referencias	56

Índice de figuras

Figura 1. Tipos de copolímeros	2
Figura 2. Reacciones representativas de los métodos de copolimerización inducida por radiación.....	4
Figura 3. Estructuras de la quitina y el quitosano.....	19
Figura 4. Estructura general de un poliuretano	25
Figura 5. Estructuras de A) quitosano y B) 2-aminoetil metacrilato.....	34
Figura 6. Gráfico de barras del grado de injerto de los copolímeros QMSx	35
Figura 7. Espectro CP/MAS ^{13}C -RMN del quitosano y del quitosano injertado con 2-aminoetil metacrilato	37
Figura 8. FTIR del quitosano y los copolímeros de injerto A) en la región de 3600-800 cm^{-1} y B) ampliación en la región de 2000-700 cm^{-1}	38
Figura 9. ATG del quitosano y los copolímeros QMSx.....	40
Figura 10. ATD del quitosano y los copolímeros QMSx	40
Figura 11. DSC del quitosano y los copolímeros QMSx: 1. ° calentamiento	41
Figura 12. DSC del quitosano y los copolímeros QMSx: Enfriamiento.....	41
Figura 13. DSC del quitosano y los copolímeros QMSx: 2. ° calentamiento	42
Figura 14. Propuesta del mecanismo para el injerto de AEMA en el quitosano	44
Figura 15. Propuesta del mecanismo para la síntesis del poliuretano	46

Figura 16. Andamio de Q-g-AEMA.....	47
Figura 17. Espectro FTIR del poliuretano de Q-g-AEMA	48
Figura 18. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de QMS2PU a diferentes magnitudes (x100, x1500, x3000 y x7000)	50
Figura 19. Análisis por micro-CT de la muestra QMS2PU	51
Figura 20. Absorbancias medidas en el ensayo de viabilidad celular del poliuretano	52

Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades químicas del quitosano.....	22
Tabla 2. Principales aplicaciones del quitosano	23
Tabla 3. Grado de injerto de los copolímeros obtenidos en los diferentes disolventes	35
Tabla 4. Datos de las propiedades termodinámicas obtenidos por ATG y DSC ...	42
Tabla 5. Señales principales del espectro infrarrojo del poliuretano obtenido.....	49

Abreviaturas

^{137}Cs	Cesio 137
^{13}C -RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono
^{60}Co	Cobalto 60
AEMA	2-aminoetil metacrilato
ATR	Reflectancia total atenuada
B	Campo magnético interno de un núcleo
B_0	Campo magnético externo
CP	Polarización cruzada
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DO	Densidad óptica
DSC (CDB)	Calorimetría diferencial de barrido
DTA (ATD)	Análisis térmico diferencial
EPR (RPE)	Resonancia paramagnética electrónica
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
M	Monómero (AEMA)
MAS	Giro en ángulo mágico
Micro-CT	Microtomografía computarizada
MTT	Bromuro de 3[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difeniltetrazólico
NMR (RMN)	Resonancia magnética nuclear
PAEMA	Poli(2-aminoetil metacrilato)

Q	Quitosano
QMSx	Copolímero Q-g-AEMA obtenido en el disolvente x
QMSxPU	Poliuretano del copolímero QMSx
Q-g-AEMA	Copolímero de AEMA injertado en quitosano
SEM (MEB)	Microscopía electrónica de barrido
Sx	Alguno de los seis disolventes utilizados para obtener el copolímero Q-g-AEMA
T_c	Temperatura de cristalización
T_d	Temperatura de descomposición
T_g	Temperatura de transición vítrea
TGA (ATG)	Análisis termogravimétrico
T_m	Temperatura de fusión
X_c	Grado de cristalinidad
ΔH_c	Entalpía de cristalización
ΔH_f	Entalpía de fusión

Unidades

°C	grado Celsius
cm ⁻¹	centímetro recíproco
cm ³	centímetro cúbico
hr	hora
kDa	kilodalton
keV	kiloelectronvolt
kGy	kilogray
kN	kilonewton
kV	kilovolt
MeV	megaelectronvolt
mg	miligramo
MHz	megahercio
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mm ²	milímetro cuadrado
mm ³	milímetro cúbico
MPa	megapascal
ms	milisegundo
nm	nanómetro

ppm	partes por millón
s	segundo
Torr	torr
μg	microgramo
μL	microlitro
μm	micrómetro
μm^3	micrómetro cúbico

Adhesividad: Propiedad de una sustancia que permite la unión entre dos superficies.

Adsorción: Proceso por el que una especie química en estado gaseoso o líquido o un sólido en disolución (adsorbato) se concentra en una superficie sólida o líquida (adsorbente).

Agente quelante: Molécula capaz de formar dos o más enlaces con un ion metálico, formando estructuras cíclicas complejas denominadas *quelatos*.

Andamios: Estructuras porosas tridimensionales que juegan un rol importante en la ingeniería de tejidos, ya que proveen el soporte necesario para las que las células se adhieran, proliferen y mantengan su función diferenciada.

Anisotropía: Cualidad de la materia de exhibir variaciones en los valores de una propiedad dependiendo de la dirección en que se midan.

Anticoagulante: Fármaco que anula o retarda la coagulación de la sangre.

Antilipémico: Fármaco que disminuye los niveles anormalmente altos de lípidos en la sangre, tales como colesterol, triglicéridos y fosfolípidos.

Antitumoral: Fármaco que previene o contrarresta la formación de tumores.

Antiulceroso: Fármaco que previene la formación de úlceras o facilita su cicatrización.

Bioadhesivo: Sustancia que se adhiere a un material biológico y es capaz de retenerse en el mismo durante un periodo de tiempo prolongado.

Biocompatible: Material que es capaz de sustituir parte de un sistema vivo o funciona en contacto con tejido vivo sin generar rechazo.

Biodegradable: Sustancia que se descompone en moléculas más sencillas por acción de ciertos microorganismos.

Biofuncional: Material que tiene una función biológica.

Biorenovable: Material orgánico de origen biológico.

Conductividad iónica: Contribución de iones de un tipo dado a la conductividad molar.

Constante giromagnética: Relación entre el momento magnético y el momento angular de un núcleo.

Copolímero de injerto: Copolímero ramificado en el que la cadena principal y las ramificaciones están constituidas por monómeros distintos. La nomenclatura utilizada para este tipo de copolímero es poli(A-g-B), donde A y B son los monómeros y la letra g viene del inglés “graft”, injerto, en español.

Copolímero: Polímero formado por más de un tipo de monómero.

Ensayo de viabilidad celular: Procedimiento que permite determinar el porcentaje de células que sobreviven a un posible efecto citotóxico.

Entalpía de cristalinización: Cantidad de calor por unidad de masa que un polímero libera al cristalizar.

Entalpía de fusión: Cantidad de calor por unidad de masa que un polímero cristalino absorbe al fundirse.

Entrecruzamiento: Formación de enlaces covalentes entre dos cadenas poliméricas o entre diferentes regiones de una cadena.

Entrega de genes: Proceso utilizado en investigación genética o en terapia génica, en el que se transfiere ADN exógeno a células huéspedes. Se puede realizar por métodos mecánicos, químicos o biológicos.

Estado basal: Configuración electrónica de menor energía y más estable.

Estado excitado: Configuración electrónica con mayor contenido de energía que el estado basal. Se suele producir por absorción de un fotón que promueve un electrón de un orbital molecular, enlazante o no enlazante, a uno antienlazante.

Floculante: Sustancia que, añadida a la dispersión de un sólido en un líquido, produce la agregación de las partículas finas del sólido formando agregados compactos llamados flóculos, facilitando así su separación del medio.

Fuerza tensil: Fuerza que un hilo de sutura puede soportar antes de romperse al anudarse, se expresa en kg/mm^2 .

Grado de cristalinidad: Cantidad fraccional de cristalinidad en un polímero.

Hemostático: Sustancia capaz de detener una hemorragia.

Historia térmica: Disposición morfológica que tienen las cadenas de un polímero como consecuencia de un tratamiento previo.

Homopolímero: Polímero formado por un solo tipo de monómero.

Iniciador: Sustancia con un enlace covalente que fácilmente experimenta una ruptura homolítica para formar radicales libres capaces de inducir una reacción en cadena.

Maleabilidad: Capacidad que presenta un material para soportar deformación plástica sin rotura y formar láminas cuando se somete a esfuerzo de compresión.

Microfibrillas cristalinas: Estructuras cristalinas formadas por cadenas de polisacárido asociadas entre sí por puentes de hidrógeno.

Hidrogeles: Materiales formados por redes poliméricas tridimensionales que son capaces de absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos.

Oligómero: Cadena relativamente corta de monómeros, cuyo crecimiento se detuvo antes de que se formara un polímero.

Polímero: Macromolécula formada por una gran cantidad de unidades repetitivas llamadas monómeros.

Propiedades de bulto: Propiedades que se presentan cuando las moléculas están conglomeradas y son distintas a las de las moléculas aisladas.

Radiación gamma: Radiación electromagnética con longitudes de onda menores a 0.01 nm y energías mayores a 124 keV.

Radiación UV: Radiación electromagnética con longitudes de onda entre 400 y 10 nm y energías entre 3.1 y 124 eV.

Radical libre: Especie química que contiene uno o más electrones desapareados y que puede existir de forma independiente.

Resonancia paramagnética electrónica: Rama de la espectroscopia en donde la radiación en la frecuencia de microondas es absorbida por moléculas, iones o átomos que poseen electrones con espines desapareados.

Estent: Tubo de malla metálica que se utiliza para mantener abierta una vena o arteria de forma permanente.

Temperatura de cristalización (en polímeros): Temperatura a la que un polímero cristaliza.

Temperatura de fusión (en polímeros): Temperatura a la que se funde un polímero cristalino (o las secciones cristalinas de un polímero semicristalino).

Temperatura de transición vítrea: Temperatura a la que un polímero amorfo (o las secciones amorfas de un polímero semicristalino) deja de ser sólido y comienza a ablandarse.

1. Introducción

1.1 Modificación de polímeros¹⁻³

El desarrollo de la humanidad desde la primera mitad del siglo XX ha estado relacionado de manera cercana a la aplicación de los polímeros y, los estudios para entender la relación entre la estructura y las propiedades de estos materiales, han contribuido significativamente al avance de este campo. Por ende, se han realizado investigaciones con el fin de mejorar sus propiedades, ya sea por la combinación o por la modificación de polímeros, para crear nuevos productos que satisfagan necesidades específicas.

La modificación de las superficies de estas macromoléculas es de gran interés, ya que permite el desarrollo de productos comercialmente importantes a través de la introducción de grupos funcionales en la capa más externa de las cadenas poliméricas. Estos grupos permiten la incorporación de propiedades específicas como hidrofiliidad, hidrofobicidad, resistencia a ataques ácido-base y estabilidad térmica, entre muchas otras; manteniendo las propiedades de bulto del polímero original. De aquí que exista un interés particular en los biopolímeros, ya que presentan ventajas sobre los polímeros sintéticos, tales como baja toxicidad, biodegradabilidad y menor costo.

Entre los métodos de modificación de superficies poliméricas, uno de los más prometedores es la copolimerización por injerto, que permite unir monómeros covalentemente a las cadenas poliméricas. Existen diversas técnicas para lograr este fin, entre las que se incluyen el injerto químico, radioquímico, fotoquímico, inducido por plasma y enzimático. Para el desarrollo de esta tesis, se aplicó la copolimerización por injerto inducido por radiación gamma.

1.2 Copolímeros⁴

Se denominan *copolímeros* aquellos polímeros que están formados por dos o más tipos de monómeros; dependiendo de cómo es que éstos se encuentran ordenados en la cadena polimérica, se pueden clasificar de la siguiente forma:

- *En bloque* – A una cadena formada por monómeros A le sigue otra constituida por monómeros B. limpio.
- *Alternantes* – Al monómero A le sigue el monómero B, a éste de nuevo el A, y así sucesivamente.
- *Estadísticos* – La sucesión de los monómeros es estadística, sin obedecer ninguna regla.
- *De injerto* – Sobre la cadena polimérica del monómero A se injerta otra del monómero B.

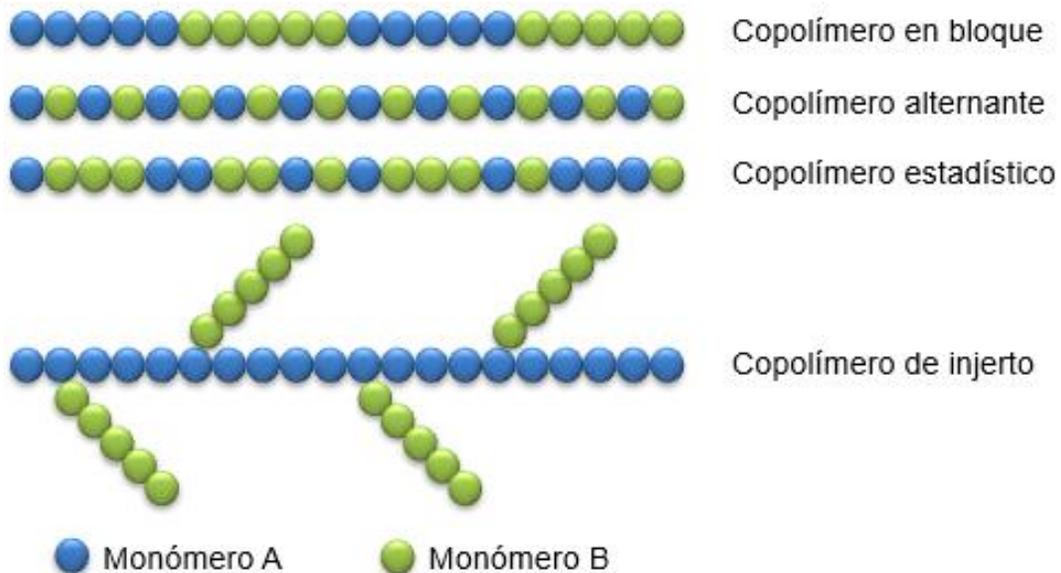


Figura 1. Tipos de copolímeros.

1.3 Injerto inducido por radiación^{2, 5, 6, 7}

El injerto inducido por radiación comprende la creación de radicales libres en las cadenas poliméricas y los monómeros al hacer incidir radiación de alta energía; los monómeros reaccionan con los sitios activos y luego se propagan para formar cadenas laterales. Este método es apropiado porque hay una rápida formación de sitios activos para iniciar las reacciones de injerto a lo largo del polímero. Los beneficios más importantes de este método son: no se requieren iniciadores, el material injertado no se contamina con compuestos químicos residuales, se puede realizar a temperatura ambiente y en cualquier estado físico. Sin embargo, es importante mencionar que altas dosis podrían causar degradación o entrecruzamiento de los polímeros.

Los tipos de radiación que suelen utilizarse son γ , UV o haz de electrones, siendo la primera la más recurrente. La fuente más ampliamente utilizada de radiación gamma es el ^{60}Co , debido a que tiene mayor energía de emisión (1.25 MeV, comparado con 0.66 MeV del ^{137}Cs), menor costo y una larga vida media de 5.3 años.

1.3.1 Métodos de injerto inducido por radiación³

El injerto inducido por radiación puede proceder por tres métodos: pre-irradiación, peroxidación y directo.

En el método de pre-irradiación, la cadena del polímero se irradia primero al vacío o en presencia de un gas inerte para formar radicales libres y después se trata con el monómero en estado líquido o vapor o como solución en el disolvente adecuado. La principal desventaja de este método es la escisión de la cadena polimérica base debido a la irradiación directa, lo que puede resultar en la formación de copolímeros en bloque.

En el método de injerto por peroxidación, la cadena base se somete a la radiación en presencia de aire u oxígeno para formar hidroperóxidos o diperoxidos. Dependiendo de la naturaleza del polímero y de las condiciones de irradiación, estos productos estables se tratan con el monómero a una mayor temperatura, con lo que se descomponen en radicales que, entonces, iniciarán el injerto. Una ventaja notable de este método es que los productos intermediarios pueden almacenarse por largos periodos antes de utilizarse en el proceso de injerto.

Por otro lado, en el método directo, el polímero y los monómeros se irradian simultáneamente, para formar radicales libres y tener una subsecuente adición. Dado que, a diferencia de los otros métodos, en éste los monómeros se someten a radiación, su gran desventaja es la formación de homopolímero.

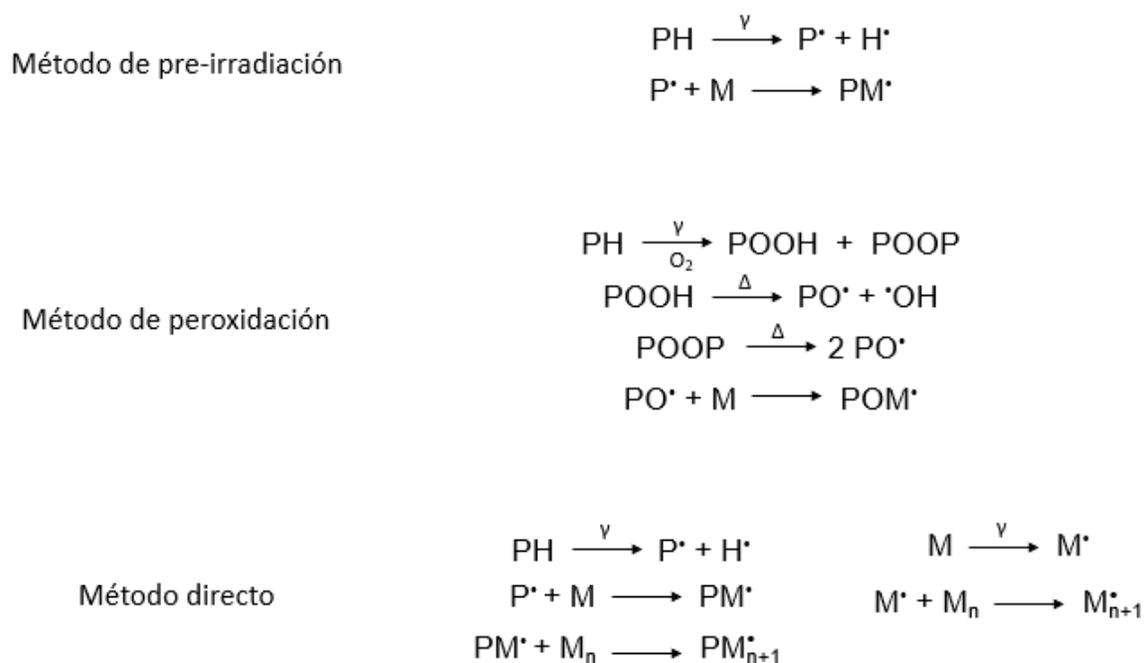


Figura 2. Reacciones representativas de los métodos de copolimerización inducida por radiación.

1.3.2 Ventajas del injerto radioinducido^{8,9}

La modificación de superficies por injerto inducido por radiación tiene varias ventajas sobre otros métodos. A continuación, se mencionan algunas de los más relevantes:

- Es un proceso simple, repetible, fácil de controlar y relativamente limpio.
- Raramente se requieren catalizadores o aditivos.
- Se puede realizar en cualquier estado físico.
- La absorción de energía por el polímero inicia el proceso vía radicales libres, a diferencia del método químico.
- El grado de injerto se puede controlar cambiando las condiciones de reacción.
- Se puede injertar una gran variedad de monómeros.
- No se requiere calentamiento del sistema para iniciar el proceso, de modo que la estructura de la cadena base no se ve modificada, y pueden injertarse monómeros sensibles a la temperatura.
- Existe la posibilidad de conseguir el injerto de monómeros diferentes en distintas proporciones en un mismo sustrato.
- Los copolímeros obtenidos tienen un alto grado de pureza.

Desde la perspectiva de las aplicaciones, la modificación de las superficies poliméricas por injerto tiene muchas importantes:

- Aumento o disminución de la hidrofiliidad o la hidrofobicidad.
- Modificación de la compatibilidad sanguínea de dispositivos médicos.
- Favorecimiento de la adición y el crecimiento celular en andamios utilizados en ingeniería de tejidos.
- Mejora de la lubricación de implantes.

- Simplificación del diseño de membranas utilizadas en baterías, celdas de combustible y cromatografía.
- Preparación de adsorbentes iónicos.

1.3.3 Factores que afectan el injerto

El grado de injerto depende de muchos factores, como: el polímero, el monómero y su concentración, el disolvente, el tipo de radiación, la temperatura y la atmósfera. Por lo tanto, el proceso puede controlarse al seleccionar estos parámetros; a continuación, se discuten algunos de ellos.

1.3.3.1 Polímero

Los materiales por injertar deben cumplir ciertos requerimientos debido a que la estructura química y la morfología afectan significativamente el grado de injerto y las propiedades finales de los productos. Para polímeros degradables por radiación, las altas dosis utilizadas típicamente en el método de pre-irradiación no se recomiendan. En contraste, los polímeros resistentes pueden modificarse por cualquiera de los métodos.

El grado de injerto depende fuertemente de la cantidad de radicales en el polímero base. Puede utilizarse la resonancia paramagnética electrónica (RPE) para monitorear los radicales formados en la muestra e identificar y rastrear la conversión de especies paramagnéticas generadas por la radiación a sus productos subsecuentes. Este método permite comparar las cantidades de radicales formados en los polímeros y es útil para predecir el comportamiento en el injerto radioinducido.

1.3.3.2 Monómero

El grado de injerto (determinado gravimétricamente por el porcentaje de aumento en masa) es una función de la reactividad del monómero consumido; ésta no depende solamente de la cinética del proceso sino también de la polaridad, la energía de los enlaces, la estructura química, la difusión hacia la superficie del polímero, etc., lo que afecta la velocidad y la eficiencia del injerto. Generalmente, a mayor concentración, el grado de injerto aumenta; sin embargo, bajo dichas condiciones es posible favorecer la homopolimerización y, por ende, disminuirlo. Para cada sistema, la concentración del monómero debe optimizarse experimentalmente.

1.3.3.3 Disolvente

El grado de injerto para el mismo monómero, dosis de radiación, atmósfera, temperatura, etc., puede diferir significativamente en función del disolvente utilizado y sus propiedades. La selección de éste afecta también la homogeneidad de las cadenas injertadas, de modo que esto puede controlarse utilizando aquellos que proporcionen un buen hinchamiento de la cadena base; para cada sistema deben probarse diferentes disolventes para encontrar el adecuado.

1.3.3.4 Radiación (dosis y tasa de dosis)

El injerto radioinducido puede realizarse utilizando radiación gamma (^{60}Co o ^{137}Cs) o de haz de electrones. En el método directo usualmente se utiliza una fuente de radiación gamma, en contraste con el método de pre-irradiación, donde la preferida es la de haz de electrones. La principal diferencia entre estos dos tipos de radiación es la tasa de dosis, que se define como la cantidad de radiación aplicada por unidad de tiempo. En el caso de los isótopos, la tasa es relativamente baja (kGy/h), mientras que para el haz de electrones es alta (kGy/s). Como

consecuencia, el tiempo de irradiación en una fuente de rayos gamma es mucho mayor (horas) que cuando se utiliza una de haz de electrones (minutos o segundos). Mientras mayor sea la dosis, mayor será el número de radicales generados en el material polimérico, lo que tendrá un impacto directo en el grado de injerto. Otros parámetros afectados por este factor son la concentración y la vida media de los radicales, la oxidación y el tiempo en el que ocurre la terminación. En el método directo, para la misma dosis, el incremento de la tasa resulta en una menor eficiencia del injerto, porque la alta concentración de radicales aumenta la recombinación llevando el proceso a una rápida terminación y con mayor homopolimerización.

1.3.3.5 Temperatura

Temperatura de irradiación - En el método de peroxidación, el sustrato polimérico debe tratarse a temperaturas por debajo de la temperatura ambiente (0°C o menos) con el objetivo de disminuir la recombinación de los radicales generados durante el proceso. Entonces, incluso después del almacenamiento, los radicales pueden utilizarse para iniciar la copolimerización. En el método directo, este parámetro afecta el grado de injerto; si se realiza por encima de la T_g , debido a la movilidad de los segmentos de la cadena, los sitios activos pueden migrar a la superficie incrementando el número de radicales involucrados en el injerto. Por otro lado, debajo de la T_g los polímeros son rígidos y, en consecuencia, los monómeros tienen acceso a los centros activos producidos en la capa externa del material. Las condiciones de temperatura también influyen en la difusión de los monómeros en disolución. De este modo, la selección de la temperatura de irradiación determina el efecto final en el proceso de injerto.

Temperatura de injerto - En general, la velocidad del injerto aumenta a mayor temperatura de reacción. En disolución hay muchas reacciones competitivas que reducen la concentración de los radicales y aceleran la terminación. Típicamente, el incremento de la temperatura se utiliza para mejorar el proceso al cambiar la

cinética de la reacción o, descomponer peróxidos y llegar así a la formación de centros activos que den paso a reacciones de propagación.

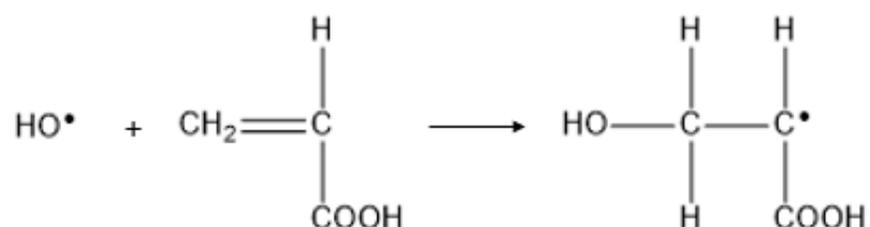
1.3.3.6 Atmósfera

El injerto radioinducido puede realizarse en atmósfera inerte, en el vacío o en la presencia de aire. La ausencia de oxígeno tiene como objetivo evitar las reacciones de radicales alquilo con este gas y, por ende, la formación de radicales peróxido, que en reacciones consecutivas formarían productos de oxidación estables. Además, los productos de esta degradación pueden ser tóxicos y afectar la tolerancia biológica, que es particularmente indeseable en los materiales que se utilizarán en aplicaciones biomédicas. En el método de peroxidación, la radiación se realiza en presencia de oxígeno, para formar los peróxidos e hidroperóxidos que, después de su descomposición térmica, inician la polimerización.

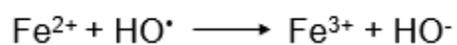
1.3.3.7 Inhibidores de la formación de homopolímero¹⁰

El uso de inhibidores de la homopolimerización es un elemento importante en el proceso de injerto radioinducido en sistemas acuosos. Durante la exposición a la radiación ionizante, se forman centros activos en el polímero y en el monómero. Si la concentración del monómero es alta y la reactividad de los radicales es elevada, la reacción predominante es la formación de homopolímero. Esto es indeseable porque la modificación de la superficie del polímero no se conseguiría. Al agregar al sistema cierta cantidad de un agente supresor, se ha mostrado reducción y, en algunos casos, la eliminación del proceso de homopolimerización, de acuerdo con investigaciones realizadas en este campo. Para este propósito se utilizan sales metálicas inorgánicas, como FeCl_2 , CuCl_2 , CuSO_4 o $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2(6\text{H}_2\text{O})$ (sal de Mohr). Hay una concentración límite de estas sales con la que se evita la homopolimerización, después de la que ya no hay formación de homopolímero, concentraciones mayores de los inhibidores afectan muy poco el grado de injerto.

Para entender el mecanismo de acción de estos iones metálicos en solución acuosa, hay que tomar en cuenta que los radicales hidroxilo, producto de la radiólisis del agua y de la degradación de hidroperóxidos y peróxidos (entre otros procesos), son capaces de reaccionar con los monómeros, como se muestra en el siguiente ejemplo:



Los iones metálicos en el sistema reaccionan con los radicales hidroxilo, evitando así que se favorezca la homopolimerización:



1.4 Caracterización de materiales poliméricos

1.4.1 Técnicas espectroscópicas^{11,12}

Las técnicas espectroscópicas para el análisis de estructuras se basan en la interacción entre el material bajo estudio y la radiación electromagnética; la información deseada se obtiene monitoreando los diferentes tipos de transiciones atómicas o moleculares en el material, inducidas al exponerlo a una fuente de radiación apropiada.

Cuando la materia se expone a una fuente de radiación electromagnética, absorbe energía y pasa del estado basal a uno excitado; cada átomo o molécula tiene su propio conjunto de niveles internos permitidos, como resultado, la energía potencial entre ellos constituye una especie de huella digital cualitativa.

Estas técnicas siempre se complementan entre sí en la elucidación de las estructuras analizadas y ofrecen la posibilidad de realizar determinaciones cualitativas y cuantitativas.

1.4.1.1 Resonancia magnética nuclear

La resonancia magnética nuclear (NMR por sus siglas en inglés o RMN en español) es la herramienta más poderosa para la determinación de estructuras orgánicas. Mediante ésta pueden estudiarse los núcleos con número de protones o neutrones impar (como ^1H o ^{13}C) y se basa en la detección de la absorción de energía electromagnética estimulada por transiciones entre niveles energéticos en el sistema bajo estudio.

Podemos visualizar un protón que gira como una esfera rotatoria con carga positiva; este movimiento genera un campo magnético interno, llamado *momento magnético*, B . En ausencia de un campo externo, B_0 , los momentos magnéticos poseen orientaciones aleatorias pero, al aplicarlo, cada protón se alinea con éste y

adquiere un estado α (de menor energía) o en contra del mismo, pasando a uno β (de mayor energía). Existe una mayor población en el primero y, se dice que los núcleos están en “resonancia” cuando se someten a pulsos de radiofrecuencia de la misma energía que la que existe entre los estados de espín. Bajo esta condición, un protón en α absorbe energía y pasa a β ; cuando el espín se relaja se libera energía que, al monitorearse y procesarse, permite obtener el espectro de RMN.

A su vez, la presencia de electrones que crean un efecto pantalla respecto a B_0 afecta a B ; es decir que depende del ambiente químico y, como resultado, al medir la frecuencia de resonancia de la energía liberada, se obtiene información sobre éste. Esta frecuencia depende directamente de la fuerza del campo aplicado, lo que hace difícil el comprar resultados obtenidos bajo condiciones diferentes; esta es la razón por la que los espectros se presentan como gráficas de intensidad de absorción (o emisión) como función del desplazamiento químico (δ) en ppm.

1.4.1.2 Espectroscopía infrarroja

Cuando las vibraciones moleculares resultan en un cambio en el momento dipolar del enlace, como consecuencia del cambio en la distribución electrónica, es posible estimular transiciones entre niveles de energía por medio de la interacción con radiación electromagnética de la frecuencia apropiada (el intervalo del infrarrojo en el espectro electromagnético va de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$). Cuando el dipolo está en fase con el vector de la radiación incidente, las vibraciones aumentan y hay transferencia de energía, entonces, la detección de estas transiciones da lugar al espectro IR de la muestra.

Los espectrómetros más utilizados son los de transformada de Fourier, que aplican esta operación matemática a la señal del espectro, que presenta la relación entre la intensidad y las diferentes frecuencias a las que ocurren las absorciones. Cada una de éstas corresponde a la deformación específica de un enlace particular en la molécula y está débilmente afectada por la presencia de

otros átomos, de modo que la frecuencia de absorción de un enlace particular es prácticamente la misma, incluso en diferentes moléculas y, como consecuencia, la principal aplicación de la espectroscopía IR es la identificación de grupos funcionales en muestras desconocidas. Ligeros cambios en la localización (número de onda) de bandas características en espectros IR de una molécula a otra son consecuencia de las interacciones entre átomos o grupos funcionales vecinos, por lo tanto, proporcionan información adicional sobre las estructuras desconocidas.

La estructura química de polímeros desconocidos puede identificarse por medio de sus frecuencias de absorción en el IR, pero no puede determinarse en su totalidad, a menos que se compare con datos conocidos o los espectros de los monómeros.

1.4.2 Técnicas térmicas^{13, 14, 15}

El análisis térmico se refiere a cualquier técnica que se utiliza para el estudio de materiales e involucra control de la temperatura. Los cambios experimentados por las propiedades de la muestra se pueden determinar de manera isotérmica como función del tiempo o a velocidades de calentamiento o de enfriamiento constantes como función de la temperatura. De esta manera, pueden estudiarse las propiedades físicas, químicas y mecánicas de los materiales bajo una atmósfera específica, como consecuencia de las variaciones que durante los procesos térmicos experimentan en su estructura y en su composición química, tales como fusión, solidificación, cristalización, oxidación, etc.

1.4.2.1 Análisis termogravimétrico¹⁶

El análisis termogravimétrico (TGA por sus siglas en inglés y ATG en español) es una técnica experimental en la que se mide la masa de una muestra como función

de la temperatura o del tiempo. En una alternativa complementaria, se utiliza la primera derivada de la curva de ATG respecto a las mismas variables; esto muestra la velocidad a la que la masa cambia y es conocida como análisis térmico diferencial o curva de ATD (DTA en inglés). La elección del programa de temperatura dependerá del tipo de información requerida

Adicionalmente, la atmósfera utilizada en el experimento juega un rol importante y puede ser reactiva o inerte, también pueden realizarse variaciones en la misma durante la medición. Diferentes efectos pueden causar que una muestra pierda o gane masa y producen saltos en la curva de ATG o picos en la de ATD.

1.4.2.2 Calorimetría diferencial de barrido¹⁵

La calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés y CDB en español) es probablemente la técnica térmica más ampliamente empleada en la ciencia de los polímeros, ésta consiste en determinar de modo cuantitativo la cantidad de calor absorbido o desprendido por una muestra en comparación con una referencia, durante una transición térmica específica.

Los experimentos típicos de CDB a velocidades de barrido constante se pueden utilizar para extraer los siguientes datos sobre polímeros amorfos o semicristalinos:

- Temperatura de transición vítrea (T_g)
- Temperatura de cristalización (T_c)
- Temperatura de fusión (T_m)
- Entalpía de fusión (ΔH_f)
- Entalpía de cristalización (ΔH_c)
- Grado de cristalinidad (X_c)

1.4.3 Microscopía electrónica de barrido^{17, 18}

La microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés y MEB en español) es actualmente el método microscópico más popular para el análisis de superficies, debido a la facilidad para manejar el equipo, la sencillez para preparar la muestra y la simplicidad de la interpretación de las imágenes. En la SEM, un haz de electrones (energías entre 1 y 50 keV) hace un barrido de las superficies en líneas secuenciales y se obtienen señales a partir de las interacciones entre el haz y la muestra, que se detectan electrónicamente y se amplifican. La señal es desplegada como una modulación brillante en un tubo de rayos catódicos o por técnicas computarizadas. La amplificación de la imagen se determina por la proporción de su longitud lateral respecto al área escaneada y puede ser de hasta 100 000 veces.

Una técnica importante en la microscopía electrónica es el uso del “sombreado”, que consiste en aplicar sobre la muestra desecada una capa delgada de un metal pesado vaporizado, como el oro. Ésta se aplica en un ángulo agudo, de modo que las zonas cercanas a la fuente del metal quedan impregnadas, pero las que están más alejadas reciben un depósito menor y crean una sombra; cuando la imagen resultante se obtiene en negativo, se produce un efecto tridimensional.

1.4.4 Microtomografía computarizada¹⁹

La microtomografía computarizada, micro-CT, es un método de imagen radiográfica, similar a las tomografías convencionales utilizadas en aplicaciones médicas e industriales, pero con la diferencia de que es capaz de alcanzar una resolución del orden de $1 \mu\text{m}^3$ o menos. Además, es un método efectivo para obtener imágenes tridimensionales de materiales porosos en la escala microscópica. En conjunto con un software de análisis de imagen digital, este método puede proveer información precisa, tanto cuantitativa como cualitativa, de la morfología en 3D de materiales complejos con alta resolución. La micro-CT

implica tomar imágenes de rayos X del material desde varios ángulos alrededor del mismo y convertirlas matemáticamente en una pila de secciones transversales que forman una única imagen tridimensional.

La micro-CT presenta algunas ventajas sobre otros métodos que se utilizan para la caracterización de materiales porosos, ya que la medición es repetible, estandarizable y sencilla de realizar; pero la más importante es que permite estudiar una gran cantidad de parámetros. Las imágenes tridimensionales permiten un análisis detallado de cualquier punto específico, evaluando la forma, el tamaño y el espesor de los poros. Al utilizarse rayos X penetrantes, los poros cerrados también pueden detectarse y si se miden el volumen total y el de los poros interconectados, es posible determinar la interconectividad. Las imágenes obtenidas también pueden usarse para predecir las propiedades mecánicas de los materiales y los efectos de los poros en su desempeño, siempre que se conozcan las propiedades de “bulto”.

1.4.5 Ensayo de viabilidad celular por el método de MTT²⁰

El bromuro de 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difeniltetrazólico (MTT) se utiliza en un método simple, que permite cuantificar la viabilidad celular establecida por el número de células presentes en un cultivo, que están determinadas en relación con la cantidad de formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables. El MTT es captado por las células y reducido por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble, denominada formazan. Este producto queda retenido en las células y puede liberarse mediante la solubilización de las mismas; como consecuencia, ocurre un cambio de coloración de amarillo a azul y, de esta forma, es cuantificada la cantidad de MTT reducido, mediante un método colorimétrico. La capacidad de las células para reducir al compuesto es un indicador de la integridad de las mitocondrias, y su actividad funcional es interpretada como una

medida de la viabilidad celular. Los resultados se expresan en porcentaje de células vivas, según la siguiente ecuación:

$$\% = \frac{DO \text{ de las células tratadas}}{DO \text{ de las células control}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

1.5 Quitina y quitosano

1.5.1 Generalidades^{21 – 26}

La *quitina*, poli-(β -(1-4)-*N*-acetil-D-glucosamina), es un polisacárido natural de gran importancia, identificado por primera vez en 1884. Es un sólido blanco, parcialmente cristalino, inodoro e insípido. Está compuesto por aminoazúcares unidos entre sí por enlaces glicosídicos β (1-4), que forman una cadena lineal de unidades de *N*-acetil-D-glucosamina, algunas de ellas desacetiladas. Posee una estructura muy similar a la de la celulosa y tienen en común su limitada solubilidad y baja reactividad; la diferencia estriba en que el carbono 2 contiene un grupo hidroxilo en la celulosa y uno acetamida en la quitina.

Este biopolímero se sintetiza por un enorme número de seres vivos y, considerando la cantidad producida anualmente en el mundo, es el polímero más abundante después de la celulosa. Se encuentra en la naturaleza como microfibrillas cristalinas ordenadas formando componentes estructurales en el exoesqueleto de artrópodos o en las paredes celulares de hongos y levaduras. También es producida por otros seres vivos en los reinos inferiores de plantas y animales, en varias funciones donde el reforzamiento y la resistencia son requeridos.

A pesar de su abundancia, sus principales fuentes comerciales han sido hasta ahora los caparazones de cangrejos y camarones. En el procesamiento industrial, es extraída de los crustáceos por tratamiento ácido para disolver el carbonato de calcio, seguido de extracción alcalina para la solubilización de proteínas. Además, se añade comúnmente un paso de decoloración para remover pigmentos remanentes y obtener un producto incoloro. El producto resultante requiere una mayor purificación, dado que proteínas y pigmentos residuales podrían causar problemas en su posterior utilización, especialmente para productos biomédicos. Este procedimiento debe adaptarse para cada fuente de quitina, debido a las diferencias en la estructura de los materiales iniciales. Por ello se trabaja en el

perfeccionamiento de los métodos de obtención, para lograr las propiedades más convenientes para distintos usos.

Por desacetilación parcial de la quitina bajo condiciones alcalinas, se obtiene *quitosano*, su derivado más importante en términos de aplicación. Cuando el grado de desacetilación alcanza cerca del 50%, se obtiene un polvo de color blanco a rojo claro que se solubiliza en soluciones ácidas diluidas; esto ocurre por la protonación del grupo $-NH_2$ en el C2 de la D-glucosamina, es decir, en medio ácido se tiene un polication.

Actualmente, la quitina y el quitosano se producen comercialmente en Noruega, India, Japón, Polonia, Estados Unidos y Australia.

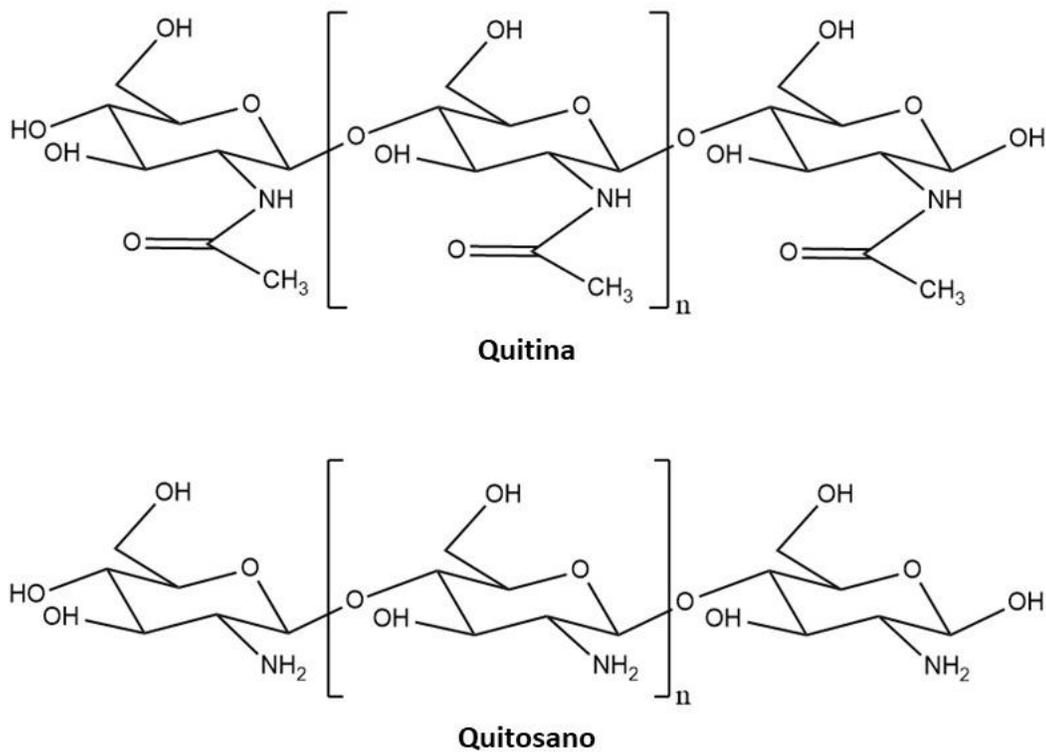


Figura 3. Estructuras de la quitina y el quitosano

1.5.2 Aplicaciones^{21, 22, 24, 26, 27, 28}

La quitina es biorenovable, biocompatible, biodegradable y biofuncional. Se utiliza como agente quelante, aditivo en el tratamiento de aguas, acarreador de medicamentos, cinta adhesiva biodegradable sensible a presión, agentes curativos de heridas y membranas, entre otras aplicaciones importantes.

Este polímero se degrada parcialmente en medio ácido para obtener una serie de oligoquitinas, fragmentos de 2 a 20 unidades de N-acetilglucosamina; cuyo tamaño molecular mucho menor, les confiere propiedades diferentes a las del polímero; tales como solubilidad en agua, bioactividad antitumoral, bactericida y fungicida, y como regulador del crecimiento en plantas y asociaciones simbióticas con éstas. Por otra parte, un factor común entre la quitina y sus derivados, es su significativo contenido de nitrógeno, que varía entre 6.14 y 8.3%, así como su elevada estabilidad química y térmica. Sin embargo, son sustratos muy susceptibles al ataque de numerosas familias de enzimas, lo que se ha relacionado con su origen natural.

Pese a sus interesantes propiedades y aplicaciones, en la actualidad, la quitina no se emplea vastamente en la industria farmacéutica; debido principalmente a su insolubilidad en agua, en disolventes orgánicos comunes y en disoluciones acuosas diluidas. Debido a esto, sus aplicaciones se ven limitadas significativamente y, en muchos casos, es más conveniente trabajar con derivados.

Por su parte, el quitosano, que también puede hallarse en la naturaleza u obtenerse de forma sintética, constituye uno de los pocos polímeros naturales catiónicos que se conocen; es soluble en disoluciones ácidas diluidas y manifiesta una potente actividad antimicrobiana. La elevada viscosidad de sus disoluciones favorece su actividad biológica, que a su vez depende de factores como la masa molecular promedio del polímero, el grado de desacetilación y la concentración de la disolución, entre otros. Además, su estructura rígida debida a numerosos enlaces por puentes de hidrógeno, le confiere estabilidad térmica.

A diferencia de otros polisacáridos presentes en la naturaleza, que son ya sea ácidos o neutros, el quitosano es altamente básico. Debido a esta propiedad se derivan otras particulares como la capacidad de formar polioxisales, películas, quelatos y floculantes para la recuperación de proteínas; además de tener ciertas características estructurales ópticas. Sus propiedades fisicoquímicas y biológicas únicas lo hacen valioso para aplicaciones farmacéuticas y biomédicas.

La presencia de los grupos funcionales hidroxilo y amino (en las unidades desacetiladas) en su estructura, permite la formación de compuestos de coordinación con iones metálicos como el cobre, el zinc y el hierro, entre otros, aunque no con los metales alcalinos o los alcalinotérreos. Estos complejos muestran una potente actividad antimicrobiana frente a algunos agentes patógenos vegetales, por lo que resultan promisorios para su aplicación agrícola. Además, poseen propiedades adsorbentes y absorbentes, que se utilizan en la remoción de colorantes, tratamientos de aguas residuales, entre otras aplicaciones. Por ello, la quitina y sus derivados tienen gran aplicación en la actividad humana.

A continuación, se resumen las propiedades químicas del quitosano, en la Tabla 1; así como sus principales aplicaciones en diversas áreas, en la Tabla 2.

Tabla 1. Propiedades químicas del quitosano.²⁹

Propiedades químicas y físicas	Aminopolisacárido lineal con alto contenido de nitrógeno
	Estructura rígida de D-glucosamina: alta cristalinidad y alta hidrofiliidad
	Capacidad de formar puentes de hidrógeno intermoleculares: alta viscosidad
	Base débil: los grupos amino desprotonados actúan como nucleófilos poderosos (pKa 6.3)
	Insoluble en agua y disolventes orgánicos: soluble en disoluciones ácidas diluidas
	Numerosos grupos reactivos disponibles para realizar entrecruzamiento
	Formación de sales con ácidos orgánicos e inorgánicos
	Formación de quelatos y complejos
Como polielectrolito (a valores ácidos de pH)	Conductividad iónica
	Biopolímero catiónico con alta densidad de carga (una carga positiva por cada residuo de glucosamina)
	Agente floculante: interactúa con moléculas cargadas negativamente
	Propiedades de atrapamiento y adsorción: filtración y separación
	Capacidad de formar películas: adhesividad
Propiedades biológicas	Materiales para el aislamiento de biomoléculas
	Biocompatibilidad: No tóxico, biodegradable, adsorbible
	Bioactividad: actividad antimicrobiana (fungi, bacteria, virus), antiácido, antiulceroso y antitumoral, anticoagulante, antilipémico
	Bioadhesividad

Tabla 2. Principales aplicaciones del quitosano.²¹

Área	Aplicaciones
Agricultura	Mecanismo de defensa en plantas Estimulación del crecimiento en plantas Revestimiento de semillas Protección contra heladas Liberación controlada de fertilizantes y nutrientes en suelo
Tratamiento de agua y residuos	Floculante para aclarado de agua Remoción de iones metálicos Polímero ecológico (eliminación de polímeros sintéticos) Reducción de olores
Alimentos y bebidas	No digerible por humanos (fibra dietética) Reducción de colesterol Conservador Espesante y estabilizante de salsas Revestimiento protector, fungistático y antibacterial para frutas
Cosméticos y artículos de aseo	Mantiene la humedad de la piel Tratamiento del acné Mejora la flexibilidad del cabello Reduce la electricidad estática en el cabello Matizante de la piel Cuidado bucal (pasta de dientes, goma de mascar)
Biofarmacia	Inmunológicos, antitumorales Hemostáticos y anticoagulantes Curativo, bacteriostático

El estudio de la quitina y el quitosano se ha intensificado desde 1990, debido a que presentan excelentes propiedades biológicas tales como la biodegradación en el cuerpo humano, además de actividad inmunológica, antibacterial y curativa. Sin embargo, el uso comercial o práctico de estos polisacáridos (incluyendo monómeros y oligómeros) se confina a sus formas no modificadas. Por ejemplo, se encontró que el quitosano es un buen candidato como material de soporte para la entrega de genes y el cultivo de células e ingeniería de tejidos pero, al no ser soluble en medios neutros o básicos, su uso se ve limitado.

Para lograr un avance en la utilización de estos polímeros, la introducción de diversos grupos funcionales en sus estructuras es un punto clave. La copolimerización por injerto es una técnica atractiva para la modificación de las superficies, ya que las propiedades de los copolímeros resultantes están ampliamente influenciadas por la naturaleza de las cadenas laterales y, de esta manera, se puede extender el uso práctico de los materiales de partida. El progreso en esta área está siendo muy rápido y el desarrollo de sus derivados exhibe un potencial de aplicación ilimitado para su uso en diferentes campos.

1.5.3 Aplicaciones en ingeniería de tejidos de poliuretanos basados en quitosano^{30 - 32}

Los poliuretanos comprenden una clase de materiales poliméricos con una gran variedad de aplicaciones que han ganado atención sustancial debido a sus propiedades que, a su vez, dependen de las de los reactivos a partir de los que se obtienen (polioles, isocianatos y extensores de cadena), de sus proporciones y de las condiciones de procesamiento. De aquí surge su amplio uso en diferentes industrias al obtener estructuras moleculares específicas para cada necesidad.

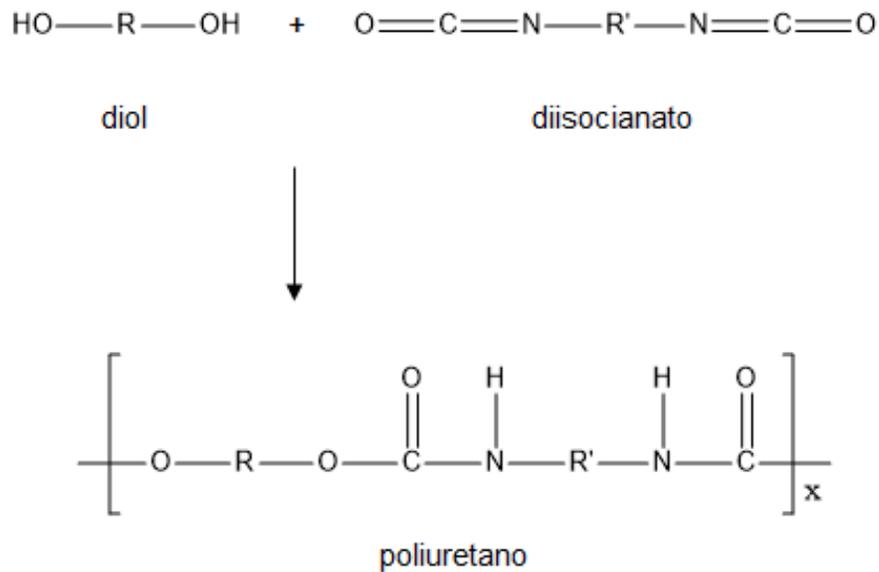


Figura 4. Estructura general de un poliuretano.

Las características de la quitina y el quitosano se aprovechan exitosamente para mejorar las propiedades bioactivas de los poliuretanos, debido a sus propiedades antioxidantes y hemostáticas, su solubilidad y sus diferentes características estructurales en diferentes medios. Los poliuretanos basados en estos materiales tienen diversas aplicaciones biomédicas, incluyendo andamios para ingeniería de tejidos, membranas de separación, estents, sensores, suturas y sistemas de liberación de medicamentos. Vale la pena mencionar que los grupos NHCOCH_3 , NH_2 y NHCOO presentes en la quitina, el quitosano y los poliuretanos son convincentemente los responsables de sus propiedades bioactivas. Puede inferirse que el grupo NHCOO es análogo al enlace peptídico (NHCO) presente en las proteínas. Por lo tanto, la incorporación de quitina o quitosano mejora la biocompatibilidad y reduce la citotoxicidad del material resultante. Aunado a esto, los poliuretanos son de bajo costo, sencilla modificación y alta disponibilidad.

Al emplear quitosano como extensor de cadena en la síntesis de poliuretanos se han reportado buenas propiedades termo-mecánicas y estructurales en los materiales resultantes. A continuación, se enlistan algunas de sus aplicaciones más relevantes:

- Síntesis de materiales utilizados como compatibilizantes sanguíneos y anticoagulantes.
- Preparación de láminas bioadhesivas para aplicaciones farmacéuticas, en las que a mayor contenido del polisacárido mejoran la adhesividad y la biocompatibilidad.
- Desarrollo de fibras quirúrgicas, debido a sus excelentes propiedades mecánicas, elasticidad, buena fuerza tensil y naturaleza no tóxica.
- Síntesis de hidrogeles utilizados como recubrimiento sobre poliuretanos, gracias a su actividad antibacterial y a que favorecen la disminución de la absorción de proteínas al mejorar su hidrofiliidad y su deslizamiento.
- Formación de andamios tridimensionales, ya que presentan biocompatibilidad, alta porosidad y las características mecánicas adecuadas para diversas aplicaciones médicas.

2. Objetivo

2.1 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar un poliuretano basado en 2-aminoetil metacrilato injertado en quitosano por copolimerización por injerto inducido por radiación gamma y determinar si éste tiene características que permitan su futura aplicación en ingeniería de tejidos.

Para cumplir con este propósito, se realizaron las siguientes actividades:

- Síntesis de copolímeros Q-g-AEMA en diferentes disolventes mediante copolimerización por injerto inducido por radiación gamma, utilizando el método directo.
- Determinación del grado de injerto para los copolímeros y selección del que obtuvo mayor valor.
- Caracterización del copolímero mediante las técnicas de RMN, FTIR, ATG y DSC.
- Síntesis del poliuretano QMSxPU en forma de andamios tridimensionales y su caracterización por FTIR, SEM y micro-CT.
- Propuesta de los mecanismos de reacción para la obtención del copolímero y del poliuretano.
- Estudio de las propiedades mecánicas, la porosidad y la citotoxicidad de los andamios obtenidos para proponer una aplicación.

3. Desarrollo experimental

3.1 Síntesis de los materiales poliméricos

3.1.1 Síntesis de los copolímeros de injerto Q-g-AEMA y determinación del grado de injerto

Los experimentos de irradiación se realizaron en un sistema al vacío (10^{-6} Torr) a temperatura ambiente. Se utilizaron quitosano en polvo (~400 mg) y AEMA en disolución (~100 mg en 3 mL de disolvente); los disolventes utilizados fueron: etanol (S1), hexano (S2), acetato de etilo (S3), cloroformo (S4), acetona (S5) y ácido acético (S6). La nomenclatura utilizada es, Q para el quitosano, Sx para el disolvente de acuerdo con lo señalado anteriormente y M para el monómero AEMA, de manera que, por ejemplo, el copolímero por injerto QMS1 fue obtenido utilizando etanol como disolvente.

Como siguiente paso, las muestras se expusieron a una fuente de rayos gamma (^{60}Co), con una tasa de dosis de aproximadamente 1,5 kGy/h y una dosis de 10 kGy, para ello se empleó un irradiador Gamma Beam 651 PT, Nordion International. Después, los productos resultantes se purificaron utilizando un Soxhlet y suficiente etanol y acetona (aproximadamente 5 L) durante 48 horas con el fin de eliminar el monómero que no reaccionó y el homopolímero poli(2-aminoetil metacrilato) (PAEMA) que se generó como producto secundario de la reacción, al ser éstos solubles en los disolventes mencionados. Los copolímeros obtenidos se secaron al vacío a 40 °C hasta alcanzar una masa constante.

Posteriormente, se determinó para los copolímeros el grado de injerto, W [%], a través del incremento en masa.

$$W = \frac{(m_g - m_i)}{m_i} * 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde m_i es la masa original del polímero base (Q) y m_g es la masa del copolímero producto de la reacción de injerto (Q-g-AEMA).

3.1.2 Síntesis del poliuretano QMS2PU

Para la síntesis del poliuretano se utilizaron el copolímero QMS2 (debido a que fue el que obtuvo el mayor grado de injerto), un diisocianato y resina hidroxilada. Para tal fin, se tamizó el copolímero con una malla de 74 μm (# 200) y luego se le añadió acetato de sodio (J.T.Baker) como formador de poros (ver Anexo I). Se utilizaron alrededor de 0.40 g de copolímero, 0.15 g de resina (Reichhold Química, Mex.), 0.030 g de diisocianato y 0.25 g de acetato de sodio para la preparación del producto. Se homogeneizó la mezcla de los reactivos y se depositaron 80 mg en un molde de acero inoxidable, que permitió la aplicación de una presión de 3 MPa durante aproximadamente 10 minutos. De los moldes se obtuvieron andamios de poliuretano de alrededor de 0.5 cm de diámetro y 3 mm de espesor, se dejaron al aire libre por 24 horas y luego se limaron para exponer los poros. Para eliminar el acetato de sodio e inducir mayor porosidad en los materiales, éstos se lavaron en un Soxhlet, utilizando agua como disolvente.

3.2 Técnicas de caracterización

3.2.1 Análisis por RMN

Los espectros de RMN en estado sólido (CP/MAS ^{13}C -RMN) de Q-g-AEMA (se utilizó la muestra QMS2 por tener mayor grado de injerto) y de Q, se obtuvieron a 75 MHz en un espectrómetro Bruker Avance II 300 MHz. Se utilizaron aproximadamente 150 mg de cada muestra y se introdujeron en un rotor de 7.5 mm. El tiempo de pulso se estableció a 2 ms.

3.2.2 Análisis por FTIR

Los análisis por infrarrojo se realizaron en un espectrómetro Bruker Vector 33 con una resolución de 4 cm^{-1} y 32 barridos en modo de transmisión. Se utilizó la técnica de reflectancia total atenuada (ATR, por sus siglas en inglés) usando un cristal de diamante.

3.2.3 Análisis térmico

Para el análisis calorimétrico del quitosano y de sus copolímeros, se empleó la técnica termogravimétrica con un equipo TA Instruments Q500, a una velocidad de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. El intervalo de temperaturas fue entre 50 y $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la masa de las muestras de entre 6 y 14 mg . Los análisis se realizaron en presencia de oxígeno ($50\text{ cm}^3/\text{min}$).

Las propiedades térmicas de Q y de los copolímeros QMSx fueron también investigadas por calorimetría diferencial de barrido, en un equipo Mettler TA4000, en atmósfera de nitrógeno ($50\text{ cm}^3/\text{min}$). En los experimentos de DSC, primero, se calentó la muestra desde la temperatura ambiente hasta aproximadamente $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ (primer calentamiento), y después se mantuvo a esa temperatura por aproximadamente un minuto. Posteriormente, en el enfriamiento, se disminuyó la

temperatura hasta 40 °C. El procedimiento anterior se utilizó para eliminar el agua en las muestras y su historia térmica. Finalmente, en el segundo calentamiento, se incrementó la temperatura desde 40 °C hasta 340 °C, con el objetivo de obtener señales alrededor de los 310 °C. Estas señales fueron débiles y se relacionaron con los puentes de hidrógeno que se forman entre el grupo amino y el grupo alcohol del material. Todo el procedimiento se realizó a una velocidad de calentamiento o enfriamiento de 10 °C/min. Las temperaturas de transición y las entalpías se determinaron de los picos exotérmicos y endotérmicos en la segunda corrida (segundo calentamiento).

3.2.4 Análisis por SEM

La morfología del polímero QMS2PU se estudió por microscopía electrónica de barrido. Las muestras fueron previamente recubiertas con oro para su análisis y se estudió la superficie de los productos con dos microscopios electrónicos de diferente resolución, operados a 15 kV: JEOL FE7800F y JEOL JSM-6060LV.

3.2.5 Análisis por micro-CT

Los andamios se sometieron a una tomografía computarizada con un sistema micro-CT de doble fuente M1 XT H, 225 kV y 450 kV de Nikon Metrology.³⁵

3.3 Estudio de las propiedades de los andamios

3.3.1 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de compresión de los andamios se calcularon utilizando una máquina de ensayo mecánico Instron modelo Adamel Lhomargy DY.22, con una celda de carga de aproximadamente 1 kN a una velocidad de compresión de 0,5 mm/min. La carga máxima aplicada a las muestras ayudó para determinar la resistencia a la compresión, mientras que el módulo de compresión se obtuvo a partir de la pendiente de la región lineal de la curva de esfuerzo/deformación. Se midieron 10 muestras para asegurar la reproducibilidad del experimento.

3.3.2 Porosidad

Para estudiar la porosidad de los andamios, se utilizó un método previamente reportado en el que se utiliza una botella de densidad (o picnómetro) con etanol. En una balanza analítica (Sartorius; Sartorius AG, Göttingen, Alemania) se midieron las masas de la botella con etanol (m_1), la misma con el andamio y el etanol (m_2) y del andamio seco (m_s). El grado de porosidad se calcula utilizando la siguiente ecuación^{34, 34}:

$$\varphi = 1 - \frac{m_1 - m_2 + m_s}{\rho_{etanol}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

3.3.3 Viabilidad celular

Para realizar experimento, se empezó por cultivar una línea celular de fibroblastos humanos (BJ1) con diferentes andamios en placas de 96 pocillos; se inocularon 2×10^4 células en cada uno con 200 μ L de medio de cultivo (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% de penicilina durante 24 horas con 5 % de

CO₂ a 37 °C. Luego, se extrajeron los andamios, se añadieron al medio 10 µL de 5 µg/mL de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio y se incubaron durante 3 horas. Posteriormente, el sobrenadante se eliminó y cada pocillo se lavó con solución salina (buffer de fosfatos) a temperatura ambiente. Para finalizar, el precipitado de formazan se disolvió con 200 µL de DMSO/isopropanol 1:1 y se midió su absorbancia a 570 nm con un lector de microplacas iMARK™ (Bio-Rad Laboratories, Inc), utilizando como blanco (control negativo) el medio de cultivo y como control positivo las células sin andamio.

NOTA: Los datos presentados en esta tesis se reportan como la media ± la desviación estándar y el estudio estadístico se realizó mediante análisis ANOVA. Los valores de P<0,05 se consideraron como estadísticamente significativos (n = 10 para las pruebas mecánicas y el estudio de porosidad y n = 15 para el crecimiento).

4. Análisis de resultados

En la Figura 5 se muestran las estructuras del quitosano y del 2-aminoetil metacrilato. La molécula del polisacárido tiene como monómero a la α -D-glucosamina, cuyos grupos funcionales principales son el grupo amino ($-\text{NH}_2$) y los grupos hidroxilo ($-\text{OH}$). Se ha identificado con un número a los 6 carbonos del biopolímero. Por su parte, el AEMA cuenta con un grupo $-\text{NH}_2$, un grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) de éster y un grupo vinilo. El monómero es un acrilato o propenoato, es decir, un derivado del ácido acrílico, en este caso un metacrilato^{36, 37}.

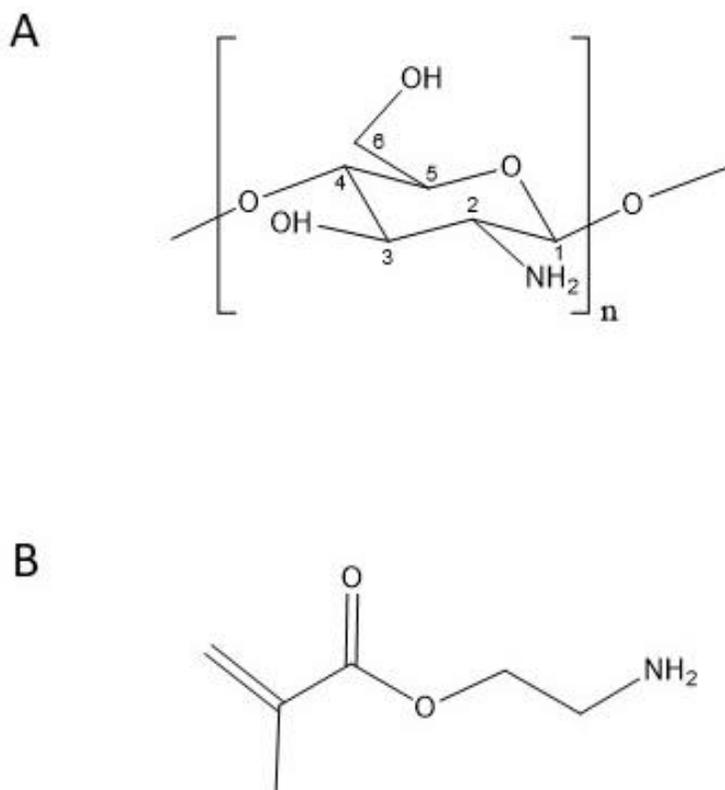


Figura 5. Estructuras de A) quitosano y B) 2-aminoetil metacrilato.

Se realizó la síntesis mediante copolimerización por injerto inducido por radiación gamma del copolímero de quitosano injertado con 2-aminoetil metacrilato que, en adelante, denominaremos Q-g-AEMA en términos generales, o QMSx en caso de que se esté estudiando el efecto de algún disolvente.

La Tabla 3 y la Figura 6 muestran los resultados del cálculo del grado de injerto de los copolímeros obtenidos en los seis diferentes disolventes:

Tabla 3. Grado del injerto de los copolímeros obtenidos en los diferentes disolventes.

Muestra	W [%]
QMS1	20.6
QMS2	72.2
QMS3	29.3
QMS4	25.8
QMS5	10.4
QMS6	31.58

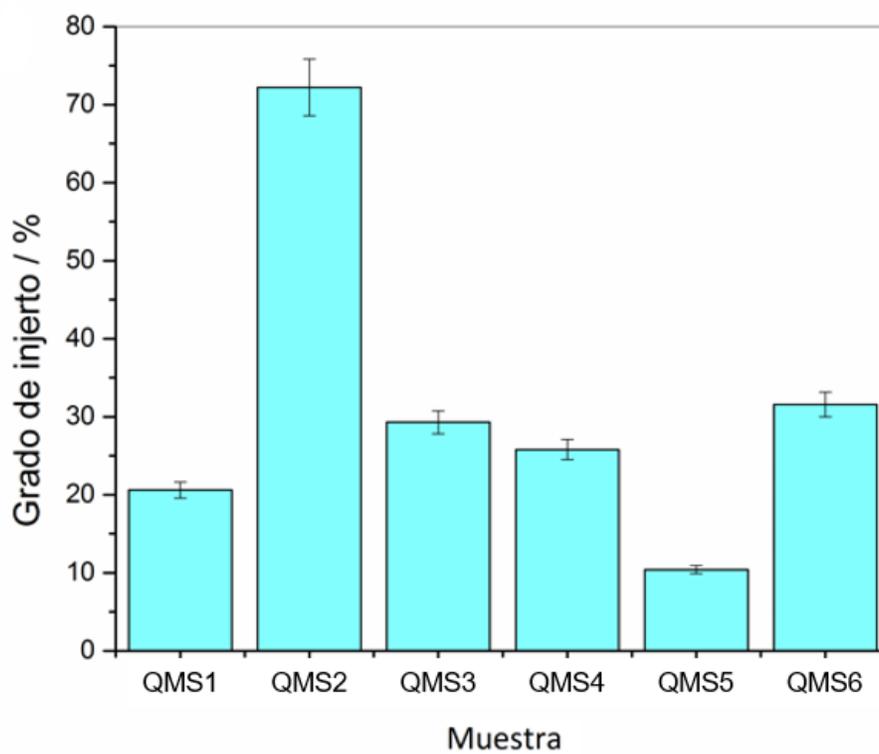


Figura 6. Gráfico de barras del grado de injerto de los copolímeros QMSx.

Se observa que, el hexano (S2) propició el mayor grado de injerto de AEMA en la cadena base. Probablemente se deba a que el hexano es el disolvente que más hincha al polímero (mayor solubilidad), lo que genera una mayor posibilidad de reacción con dicha molécula; eso explica por qué para los disolventes más polares (S1 y S5) se obtuvieron los porcentajes más bajos. No obstante, salta a relucir el valor obtenido para la muestra sintetizada en ácido acético (S6), ya que se esperaba por la solubilidad del quitosano en soluciones ácidas, que ésta tuviera el valor más alto, pero los resultados indican que al usar este disolvente se favorecen las reacciones de terminación y entrecruzamiento, disminuyendo así el grado injerto en comparación con la muestra QMS2, aunque su valor es aún mayor que el resto de las muestras evaluadas.

Por otra parte, fue necesario demostrar, utilizando métodos espectroscópicos, que se obtuvo el copolímero. La Figura 7 muestra el espectro de ^{13}C -RMN de sólidos del quitosano y el polisacárido injertado con 2-aminoetil metacrilato. Se observa para Q, de izquierda a derecha, una señal en 174 ppm (C=O) que, unida a la señal en 24 ppm (CH_3), nos indica que el reactivo no se encuentra totalmente desacetilado, es decir, hay grupos acetilo (CH_3CO) presentes en la muestra. Las señales en 105 ppm, 81/83 ppm, 75 ppm, y 57/60 ppm corresponden a los carbonos C1, C4/C5, C3, y C2/C6, respectivamente (ver numeración de carbonos en la Figura 5). Cabe destacar que las señales C1 y C2 pierden intensidad en el espectro del copolímero y se vuelven relativamente más anchas con respecto a Q, lo que es una evidencia de polimerización. La característica más llamativa del espectro Q-g-AEMA es la nueva señal a 45 ppm, que sugiere un desplazamiento de la señal de C2 como consecuencia del injerto. Se propone que la estructura del copolímero es como se indica en la Figura 7, ya que, la evidencia señala que el enlace doble del monómero reaccionó con el grupo amino para injertarse a la molécula de quitosano. Derivado de que el producto se purificó con Soxhlet para eliminar el monómero, se descartó la opción de que la señal en 45 ppm fuera de AEMA; por lo anterior, queda la posibilidad de que ésta corresponda a los oligómeros de poli(2-aminoetil metacrilato) (PAEMA), sin embargo, al ser éstos

pequeños, tienen poca posibilidad de dar señales tan claras de CH₂. Como se puede notar, la contribución de grupos carbonilo de PAEMA al espectro de quitosano es despreciable. La técnica de RMN proporcionó la primera evidencia de injerto, que sugiere la modificación química del quitosano en la región de C1/C2 con una alta probabilidad de que haya habido una modificación del grupo -NH₂. A continuación, se presenta el estudio por espectroscopía infrarroja que se realizó con fin de encontrar más evidencias sobre la obtención del copolímero de injerto.^{38,39}

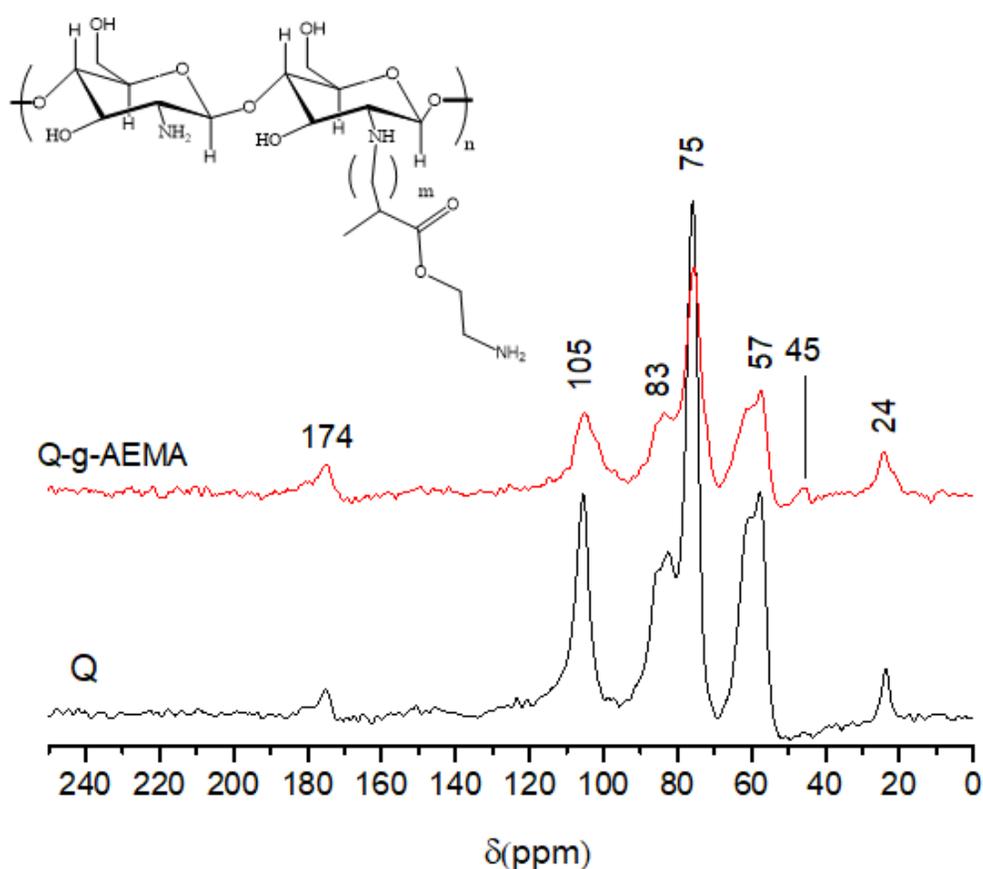


Figura 7. Espectro CP/MAS ¹³C-RMN del quitosano y del quitosano injertado con 2-aminoetil metacrilato.

Los espectros FTIR del quitosano y los copolímeros de injerto en la región de 3600–700 cm⁻¹ se muestran en la Figura 8.

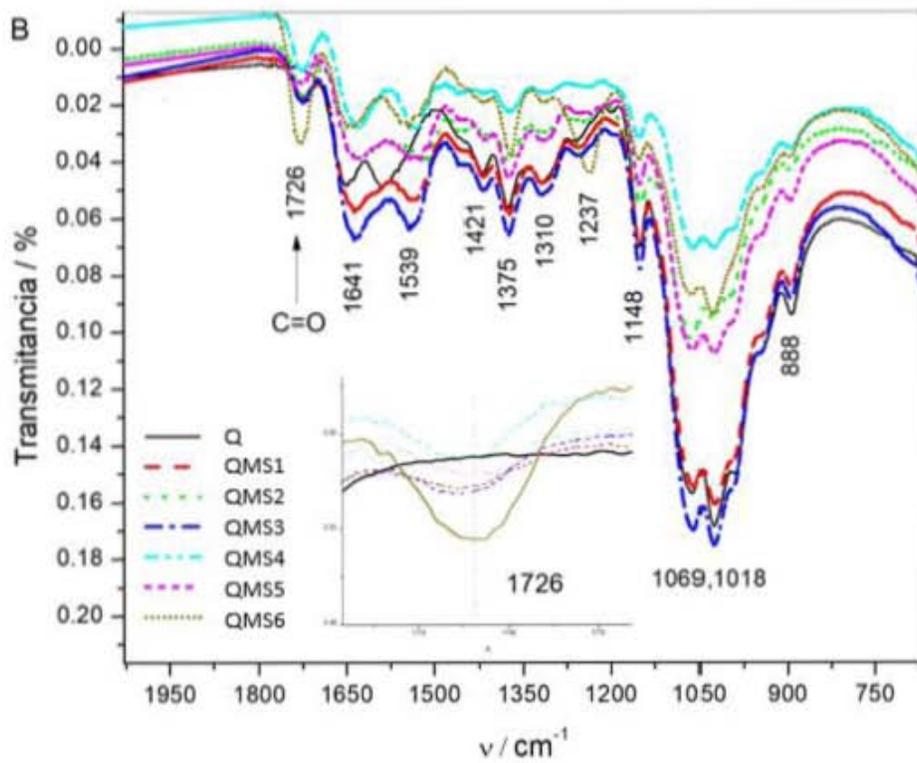
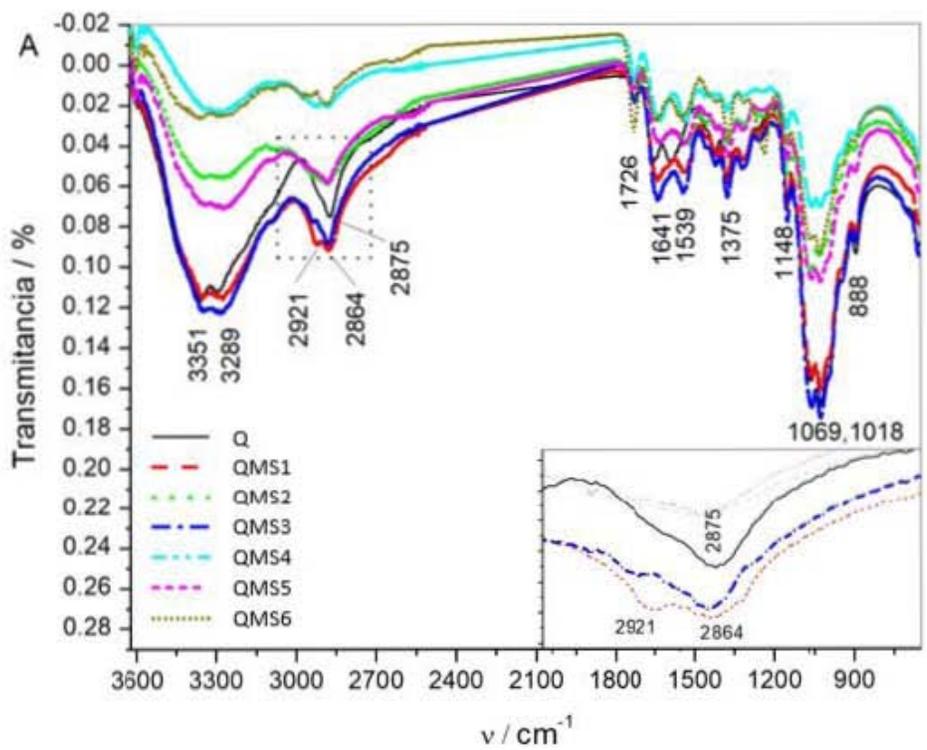


Figura 8. FTIR del quitosano y los copolímeros de injerto A) en la región de 3600–800 cm^{-1} y B) ampliación en la región de 2000–700 cm^{-1} .

El monómero injertado, AEMA, no tiene nuevos grupos funcionales que puedan detectarse como evidencias del injerto. Por una parte, el grupo carbonilo de PAEMA se puede confundir con el de grupos acetilo (CH_3CO), sin embargo, como se puede constatar en la Figura 8 B, el quitosano no presenta señal en 1726 cm^{-1} , lo que es consistente con la presencia de $\text{C}=\text{O}$ de PAEMA y, por consiguiente, una evidencia de injerto.

Al analizar las señales del espectro del quitosano y sus copolímeros, se observan las bandas en 3351 cm^{-1} y en 3289 cm^{-1} correspondientes a las señales de hidroxilo (O-H) y amino (N-H), respectivamente. Las diferencias entre los espectros de los productos se presentan únicamente en la intensidad de las bandas. Por otro lado, el quitosano tiene una sola señal en 2875 cm^{-1} , que es característica del enlace C-H. Como se puede apreciar, los copolímeros tienen, en algunos casos (QMS1 y QMS3), dos bandas en esa región, en 2921 cm^{-1} y en 2864 cm^{-1} . La nueva banda sugiere la presencia de una nueva vibración de estiramiento de enlace C-H, que se asigna al carbono β del doble enlace del monómero AEMA, que reacciona con el grupo amino del quitosano para formar el enlace $\text{R}_1\text{-NH-C}_\beta\text{H-R}_2$, donde R_1 es el quitosano y R_2 el PAEMA. El C_β no se forma en todos los casos, lo que explica por qué no todos los materiales presentan la señal y al mismo tiempo es una evidencia reveladora del mecanismo de la reacción del injerto. El resto de las señales del espectro no mostraron diferencias importantes, solamente en la intensidad de las bandas, por ejemplo, las bandas de grupo piranósido a 1069 cm^{-1} . La ausencia de la señal $\text{C}=\text{C}$ (1613 cm^{-1}) indica que las muestras QMSx se purificaron correctamente y no hay cantidades considerables de monómero en el producto.

Hasta este punto, las evidencias que se obtuvieron a partir de la RMN y del FTIR de los productos, indican que el copolímero Q-g-AEMA se obtuvo con éxito. A continuación, se muestra en las Figuras 9-13 el estudio calorimétrico del quitosano y los copolímeros QMSx y, en la Tabla 4, se resumen los valores de las propiedades termodinámicas estudiadas.^{40, 41}

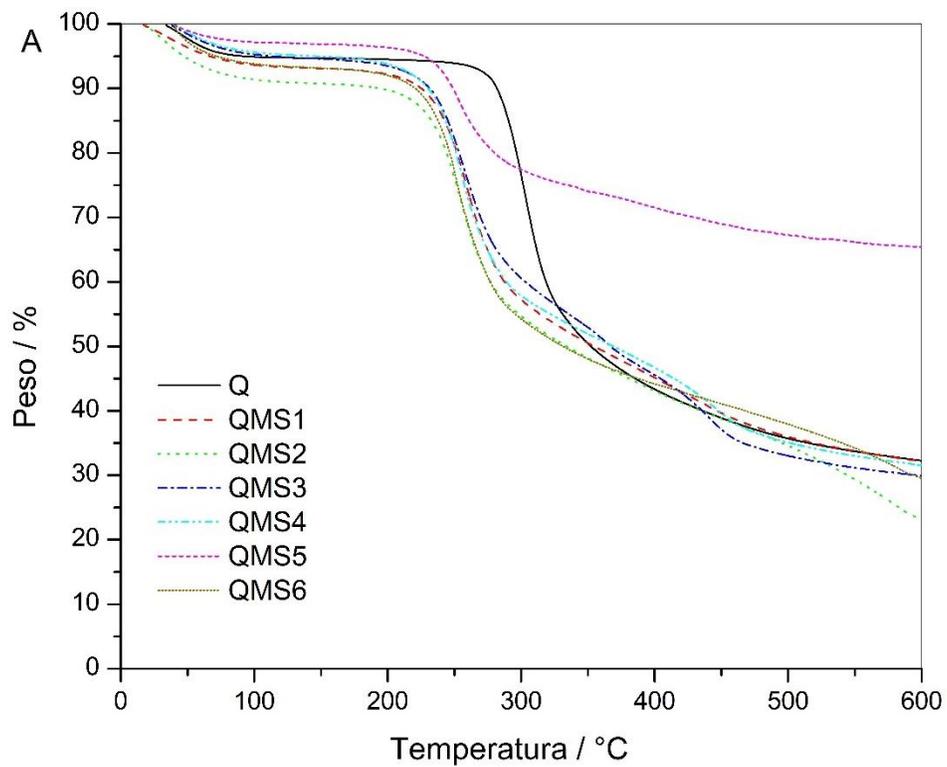


Figura 9. ATG del quitosano y los copolímeros QMSx.

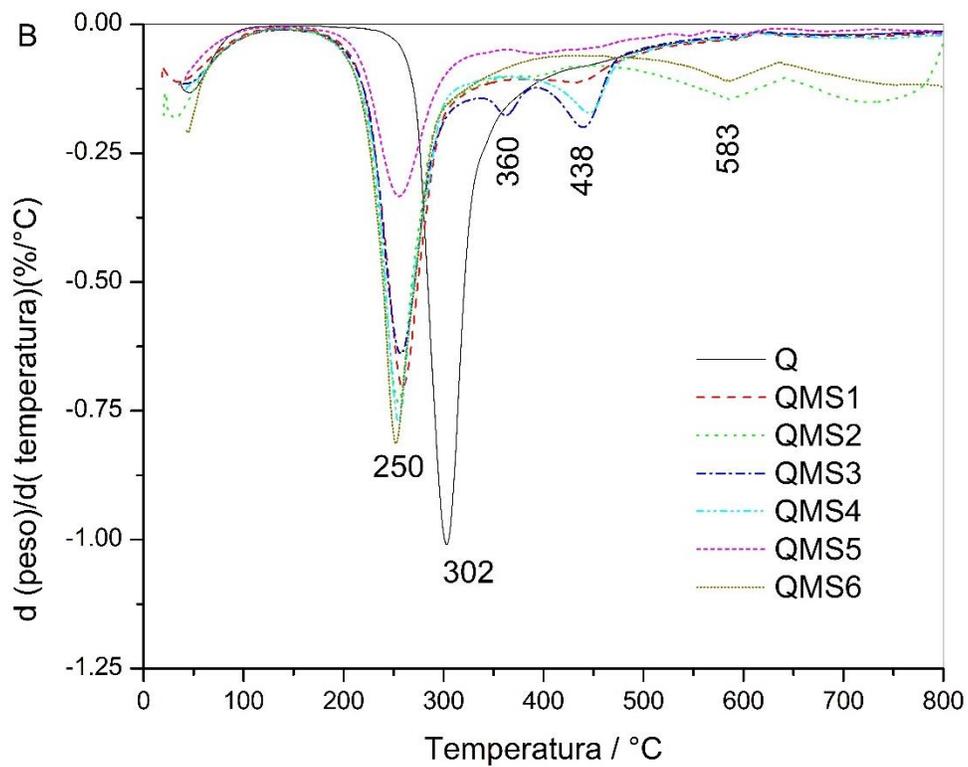


Figura 10. ATD del quitosano y los copolímeros QMSx.

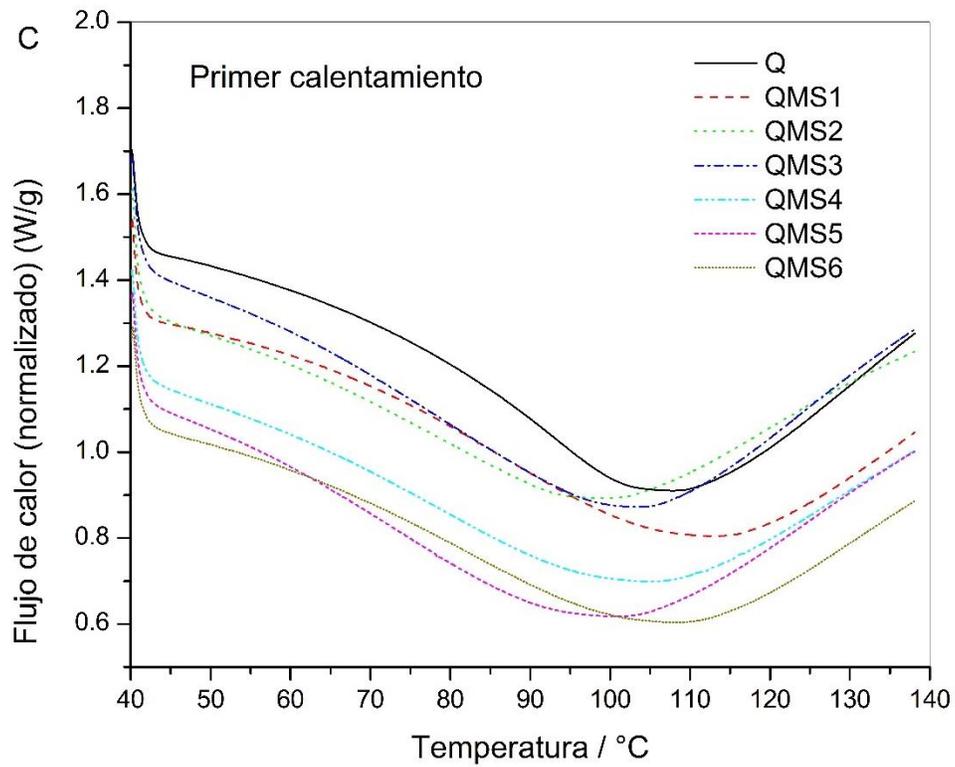


Figura 11. DSC del quitosano y los copolímeros QMSx: 1.º calentamiento.

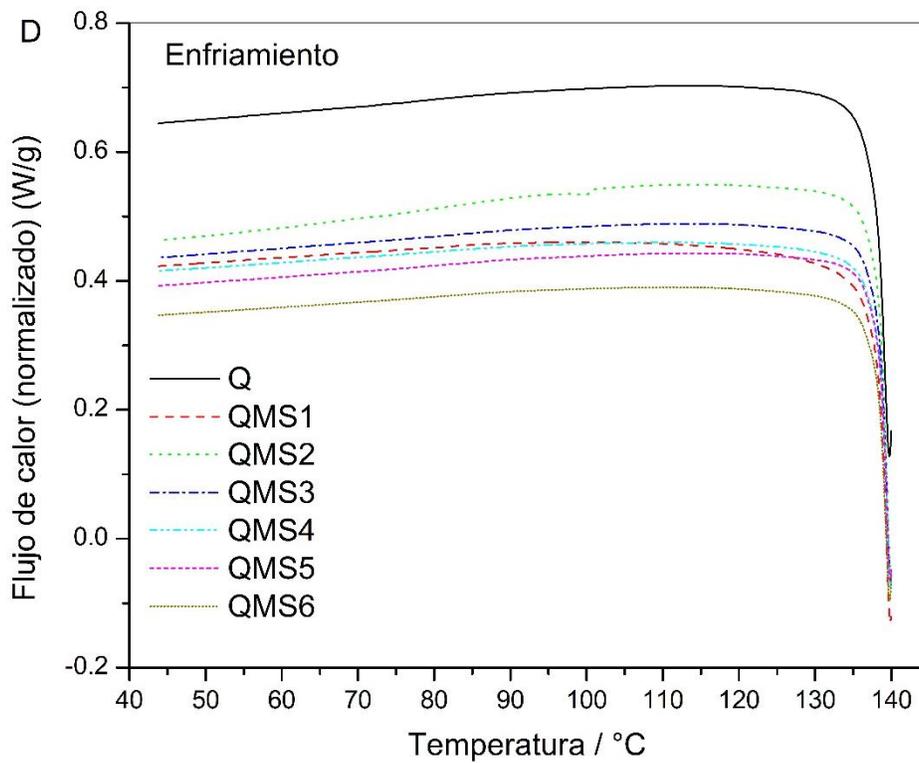


Figura 12. DSC del quitosano y los copolímeros QMSx: Enfriamiento.

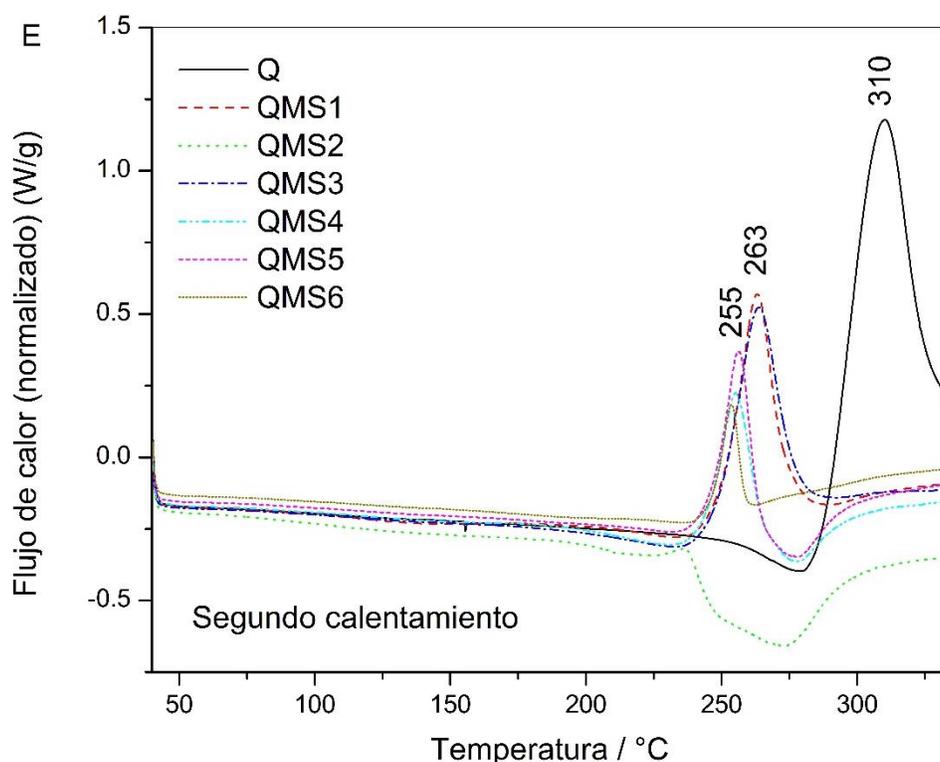


Figura 13. DSC del quitosano y los copolímeros QMSx: 2.º calentamiento.

Tabla 4. Datos de las propiedades termodinámicas obtenidos por ATG y DSC.

	T_d [°C]	ΔH [J/g]	T_m [°C]	T_g [°C]
Q	302	164.0	310	155.4
QMS1	259/434	152.0	263	129.4
QMS2	254	150.3	236	127.3
QMS3	256/361/439	154.4	263	128.4
QMS4	254/445	152.4	255	129.5
QMS5	254/392	156.2	256	127.5
QMS6	252/590	152.5	253	126.4

En las Figuras 9 y 10 se observan el análisis termogravimétrico y su derivada, respectivamente; el termograma del quitosano indica que éste se descompone en un solo paso, su temperatura de descomposición se obtuvo del ATD y su valor es de 302 °C. Por otro lado, los copolímeros de injerto mostraron dos pasos e incluso, en el caso de la muestra QMS3, tres picos de descomposición. Estas

temperaturas de descomposición de los copolímeros se aprecian antes (i.e., 259 °C) y después (i.e., 434 °C) de la temperatura de descomposición del quitosano, es decir, hay una alteración de este parámetro como consecuencia del injerto. En todos los casos, las entalpías y las temperaturas de fusión de los productos fueron menores que las del quitosano, lo que es consistente con una disminución del peso molecular debido al efecto de la radiación gamma y al injerto por polimerización radio-inducida⁴³⁻⁴⁵.

Se sabe que la temperatura de transición vítrea del quitosano varía dependiendo de su grado de acetilación; en este caso, se determinó un valor de 155.4 °C. Como se puede observar en la Tabla 4, para todos los copolímeros se obtuvieron valores por debajo de éste, lo que constituye una evidencia más del injerto, ya que se esperaba que al reaccionar el AEMA con el quitosano disminuyera la rigidez de la molécula del polisacárido^{46, 47}.

Tanto los resultados de la determinación gravimétrica del grado de injerto, como los del análisis calorimétrico, son consistentes con las espectroscopías de RMN e infrarroja, confirmando la obtención de los copolímeros de injerto Q-g-AEMA. Con las evidencias obtenidas, se propuso un mecanismo de reacción para la obtención de los copolímeros de injerto, considerando un medio ideal en ausencia de disolventes; éste se muestra en la Figura 14.

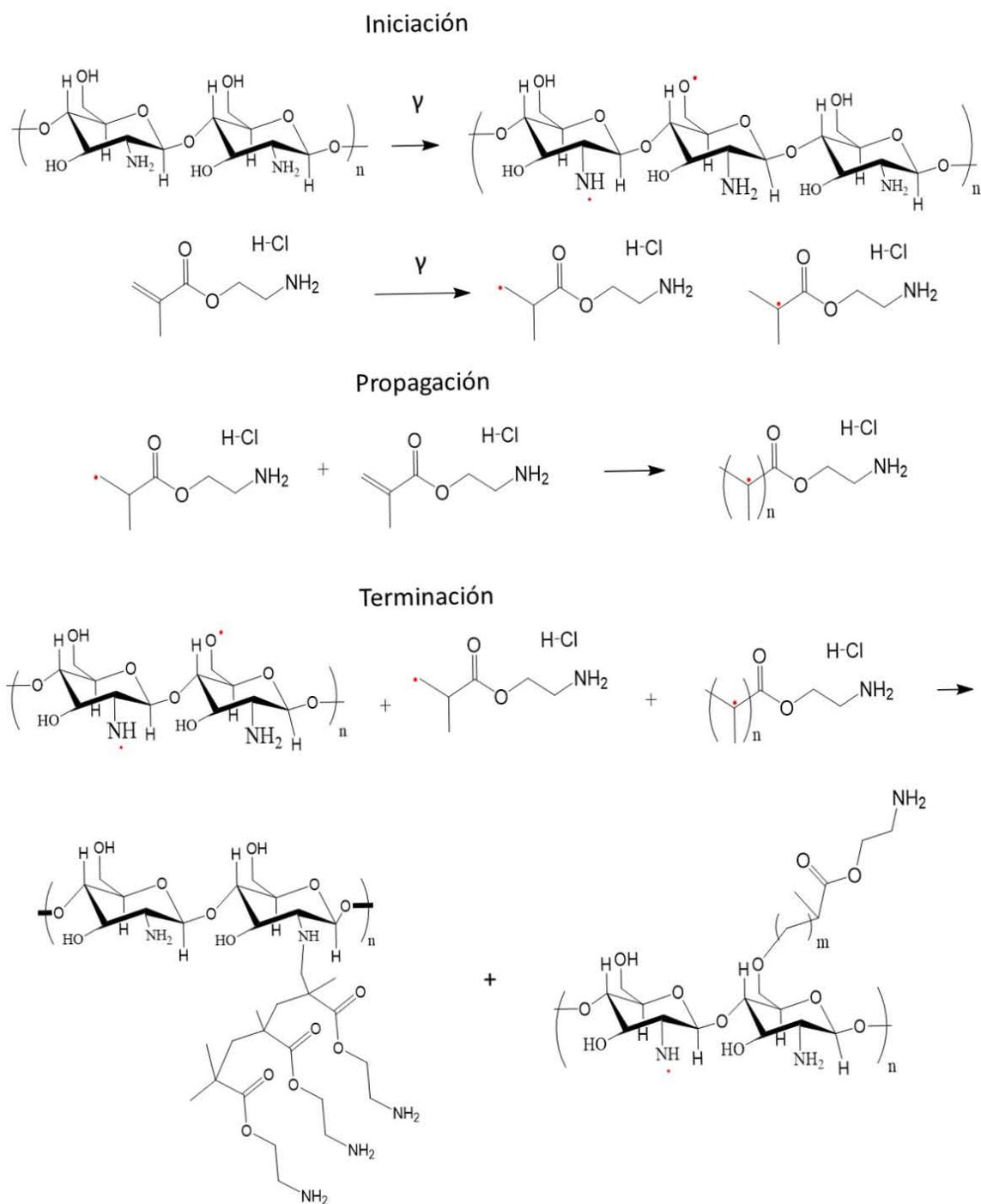


Figura 14. Propuesta del mecanismo para el injerto de AEMA en el quitosano.

El mecanismo consta de tres etapas: iniciación, propagación, y terminación; que son características de una polimerización de adición por radicales libres:

En la etapa de iniciación, las radiaciones de alta energía inciden sobre la mezcla de quitosano y 2-aminoetil metacrilato generando radicales libres en los grupos hidroxilo y amino del polisacárido y en los carbonos del metacrilato. En la etapa de propagación, los radicales del AEMA pueden reaccionar entre sí o con el monómero para formar oligómeros radicálicos de diferentes longitudes de cadena que, a su vez, pueden acoplarse con los radicales de los grupos hidroxilo o amino del quitosano, en la etapa de terminación. En el mecanismo se presentan las dos opciones, pero con base en las evidencias obtenidas por espectroscopía, se sabe que la reacción está desplazada hacia el acoplamiento con el radical amino del quitosano para formar la estructura que aparece en la Figura 7. Aunque no se obtuvo evidencia de la formación de la segunda estructura, no se descarta su formación. Nótese que, aunque se representa el injerto sobre un grupo hidroxilo en particular, cualquiera de éstos en la molécula de quitosano puede reaccionar; en contraste con el grupo amino, para el que sólo existe una opción. Es comprensible que, si el quitosano está acetilado, disminuye la posibilidad de que el AEMA reaccione por el grupo hidroxilo, esto es consistente con la reacción por el grupo amino. La etapa de terminación podría involucrar también el acoplamiento de los radicales de homopolímero con otros radicales que se encuentren en el medio, para que la cadena, injertada o no, termine con un grupo $\bullet\text{CH}_3$, $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{CH}_2$, etc.

Cabe mencionar que la reacción es mucho más complicada e involucra, entre otros factores; disminución del peso molecular por efecto de la radiación sobre el material, entrecruzamientos, degradación, múltiples combinaciones de radicales del homopolímero para acoplar con los posibles radicales del quitosano, solvatación del monómero, formación de nano-hidrogeles de AEMA por efectos del disolvente (incremento de la viscosidad del medio), etc. Es por esta razón que se utilizó el Soxhlet para eliminar los subproductos no deseados.

Los copolímeros obtenidos son polvos, de color amarillo claro, poco solubles en prácticamente cualquier disolvente orgánico y carecen de propiedades mecánicas adecuadas para su aplicación directa y práctica en ingeniería de tejidos. Por lo que, para mejorarlas, se sintetizó un poliuretano utilizando una resina alifática hidroxilada (polietilenglicol/1,4-butanodiol) y diisocianato (1,4-diisocianobutano). La Figura 15 muestra la propuesta de mecanismo de reacción para la obtención de este material.

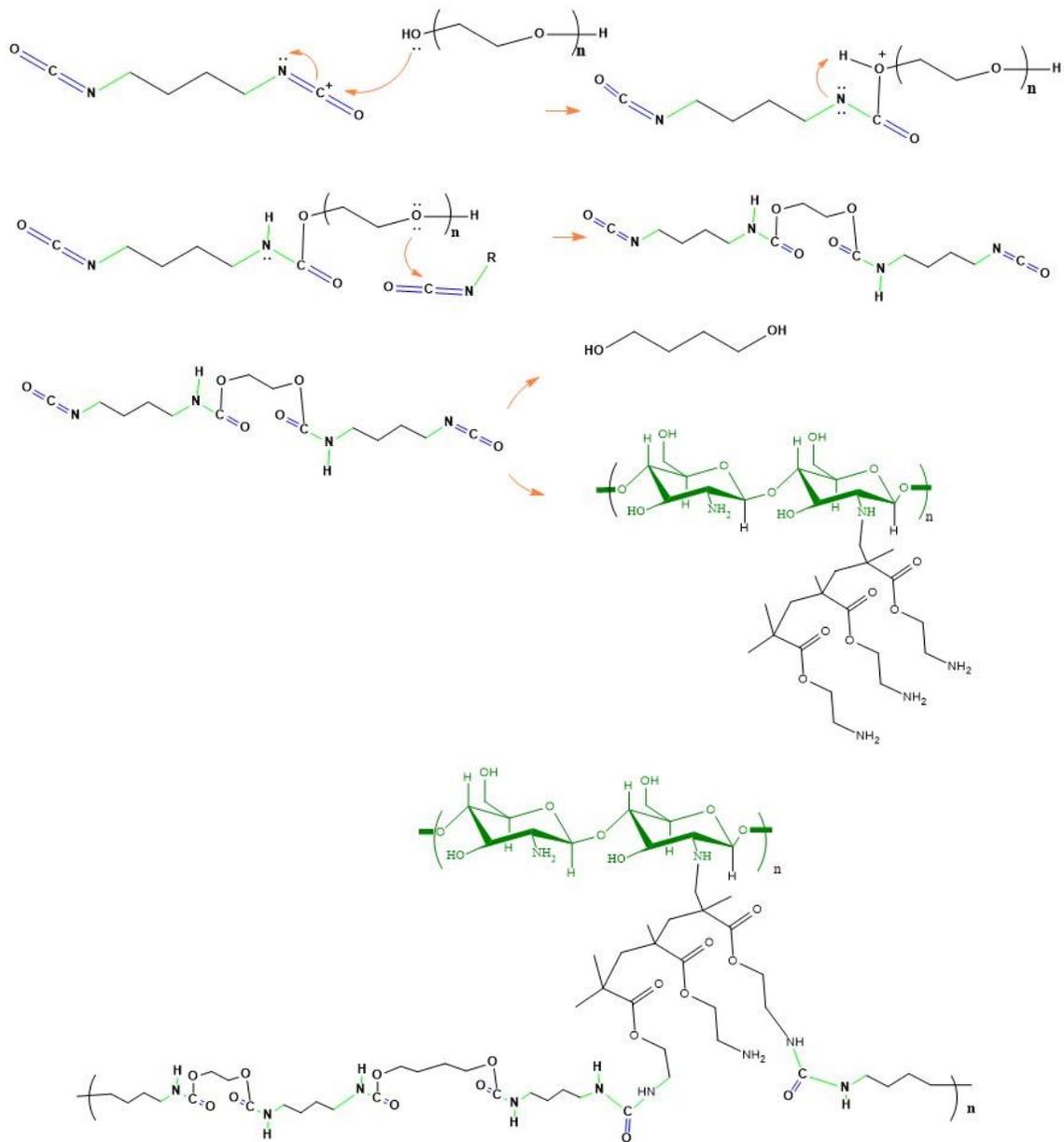


Figura 15. Propuesta del mecanismo para la síntesis del poliuretano.

El polietilenglicol (PEG) actúa como endurecedor para formar una especie iónica intermediaria, que se puede recombinar para formar un pre-polímero con dos grupos isocianato que pueden reaccionar con el 1,4 butanodiol o con el copolímero Q-g-AEMA, que actúan como extensores de cadena; estos últimos pueden formar grupos uretano y urea, respectivamente. El mecanismo conlleva a la formación de un poliuretano constituido por varios segmentos: el primero, es un segmento flexible de cadena lineal de PEG; el segundo, una cadena lineal flexible de 1,4 butanodiol; el tercero, forma una cadena rígida de Q-g-AEMA (poliurea). Nótese que para la reacción del tercer segmento ocurre entre los diisocianatos y los grupos amino de la AEMA, pero también es posible que reaccionen con los grupos amino del quitosano que no reaccionó con el AEMA. Como consecuencia de la mezcla de poliuretanos, el material compuesto obtenido es una estructura rígida que puede utilizarse para formar andamios con aplicación en ingeniería de tejidos en cultivo de células y tejidos in vitro e in vivo. Se muestra a continuación, en la Figura 16, una imagen de un andamio formado con el poliuretano.



Figura 16. Andamio de Q-g-AEMA.

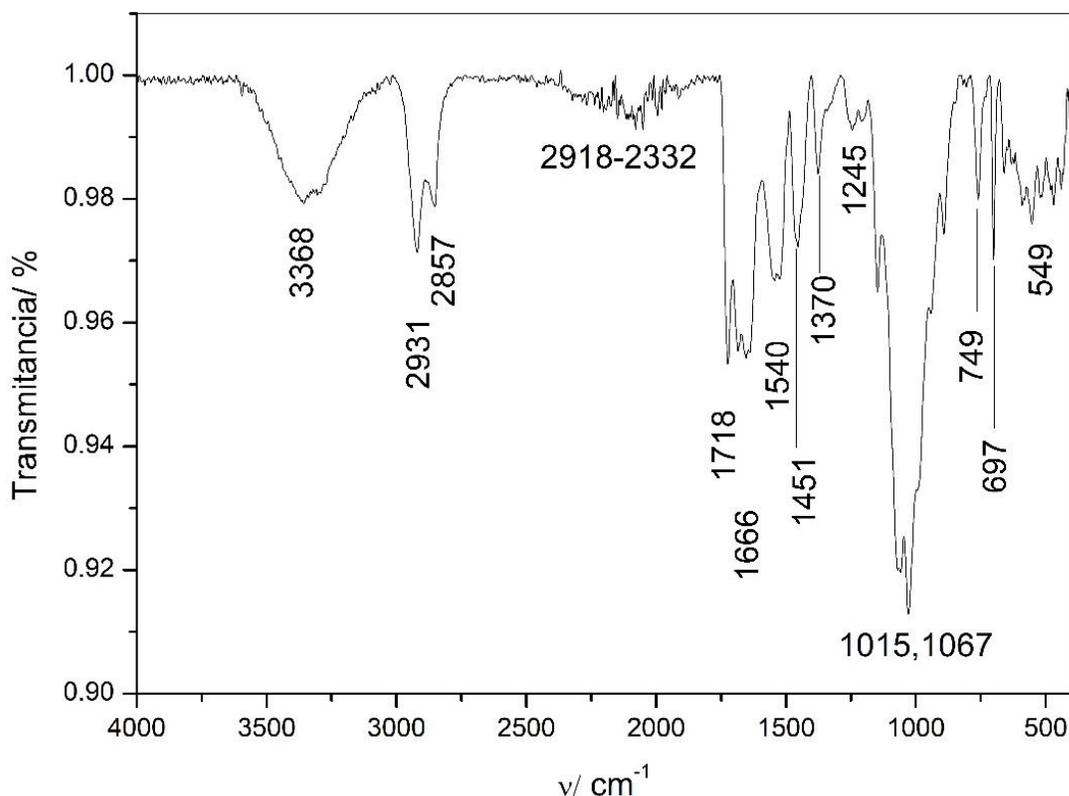


Figura 17. Espectro FTIR del poliuretano de Q-g-AEMA.

La Figura 17 muestra el espectro FTIR del poliuretano QMSxPU. De izquierda a derecha se observa una banda ancha centrada en 3368 cm^{-1} , que representa las señales de los grupos hidroxilo y amino del quitosano a 3351 cm^{-1} y 3289 cm^{-1} , respectivamente. La disminución de la intensidad y el incremento del ancho de la banda con respecto al espectro del quitosano indican que la proporción de grupos funcionales disminuyó como consecuencia de la polimerización por injerto y la preparación del poliuretano. Por su parte, la señal característica de C-H del polisacárido a 2875 cm^{-1} no se observa y se aprecia un desdoblamiento bien definido de la señal a 2931 cm^{-1} y 2857 cm^{-1} . Anteriormente mencionamos que la banda a 2857 cm^{-1} sugiere una nueva vibración de estiramiento de carbono β del copolímero por injerto. La señal de baja intensidad a $2918\text{--}2332\text{ cm}^{-1}$ corresponde a la primera evidencia de formación de poliuretano (grupo $\text{N}=\text{C}=\text{O}$), que es una señal de baja intensidad muy fácil de reconocer. En 1718 cm^{-1} encontramos una señal bien definida de C=O de PAEMA injertado y poliuretano (ver producto final

de la Figura 21). La tercera evidencia de formación de poliuretano es la presencia de las señales a 1451 cm^{-1} , 1540 cm^{-1} y 1666 cm^{-1} que son bandas características de estiramiento N-H de uretano. Por otro lado, se identificaron las señales en 1015 cm^{-1} y 1067 cm^{-1} que se atribuyen a la vibración de valencia del grupo C–N, y las señales a 697 cm^{-1} y 749 cm^{-1} que fueron asignadas a la vibración de doblaje fuera del plano N–H, éstas pueden tomarse como evidencias adicionales de la obtención de material propuesto. Todas las evidencias espectroscópicas mencionadas indican que se obtuvo el QMSxPU con éxito.^{41,44,48-50} En la Tabla 5 se resumen las señales principales del análisis infrarrojo.

Tabla 5. Señales principales del espectro infrarrojo del poliuretano obtenido.

Pico (cm^{-1})	Asignación
3368	-OH, NH_2 de quitosano
2931 y 2857	Vibración de estiramiento de C-H carbono β del Q-g-AEMA
2918-2332 (baja intensidad)	N=C=O
1718	C=O de PAEMA y poliuretano
1451, 1540, 1666	N–H de uretano
1015 y 1067	Valencia del grupo C–N
697 y 749	Doblaje fuera del plano N–H

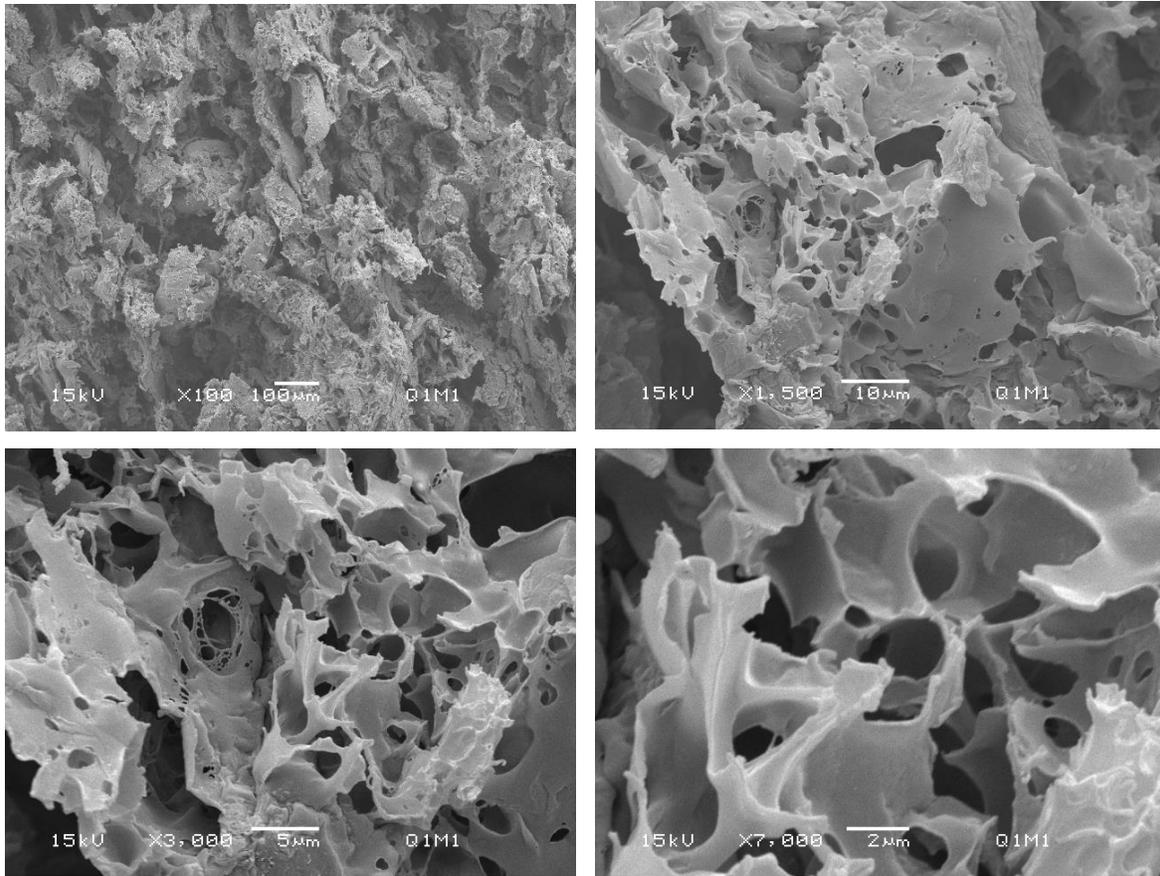


Figura 18. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de QMS2PU a diferentes magnitudes (x100, x1500, x3000 y x7000).

Una vez demostrado que se obtuvo el poliuretano QMS2PU, resultó importante estudiar algunas de sus características para evaluar si es posible utilizarlo para alguna aplicación en ingeniería de tejidos. Iniciando con un estudio morfológico, en la Figura 18 se presentan las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido. Como se puede apreciar, el formador de poros logró generar alta porosidad e interconectividad en las muestras, lo que es un requisito para su uso como soporte para cultivo celular. Por esta técnica no es posible obtener con exactitud mediciones de la porosidad, por lo que se recurrió al método de botellas de densidad con etanol y a la micro-CT.

La masa promedio de los andamios fue de aproximadamente 185 ± 5 mg y el grado de porosidad determinado por el método de densidad fue de 72 ± 7 %. Por su parte, el módulo de Young a compresión y la tensión en la carga máxima fueron de 13 ± 4 % y $1,5 \pm 0.5$ MPa, respectivamente; lo que indica que los poliuretanos son más resistentes que los materiales de partida, aunque siguen siendo materiales con poca resistencia, como consecuencia de la alta porosidad. Se utilizó la técnica complementaria de micro-CT para la determinación de la porosidad (Figura 19). Los andamios estudiados mostraron las siguientes propiedades morfométricas: porosidad media $76 \pm 0.5\%$, densidad superficial promedio de 15 ± 0.2 mm²/mm³, grosor promedio de la pared de 25.3 ± 3.5 μm, y tamaño de poro promedio de 45 ± 2.5 μm.

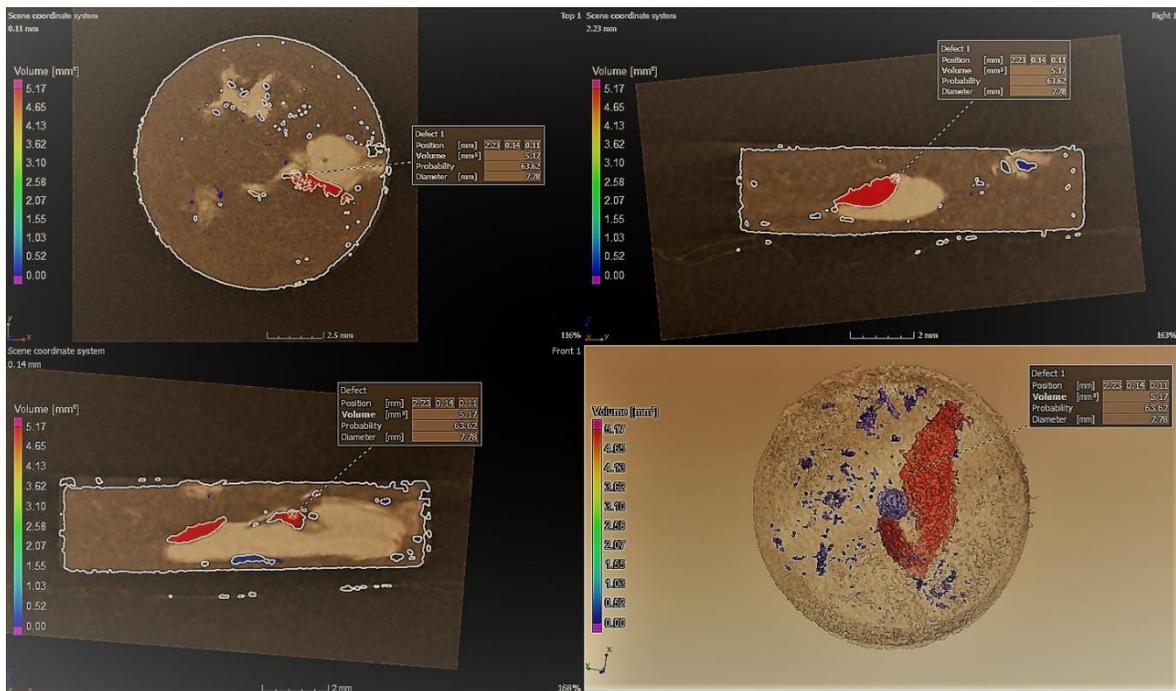


Figura 19. Análisis por micro-CT de la muestra QMS2PU.

Los resultados obtenidos por micro-CT son consistentes con la técnica de densidades y con los análisis de morfología realizados por SEM. Es de notar, en la Figura 19, que en algunos casos ocurre acumulación de resina o acetato de sodio (zona en color rojo), que conlleva a la formación de defectos en la preparación de los andamios. Sin embargo, como se puede observar, la superficie y las paredes son homogéneas.

Por último, en la Figura 20, se muestran en un gráfico de barras las absorbancias medidas para el control positivo y para las células expuestas al andamio en el estudio de viabilidad celular. Con estos valores se calculó una viabilidad celular de aproximadamente 95%, es decir, los andamios no presentan citotoxicidad.

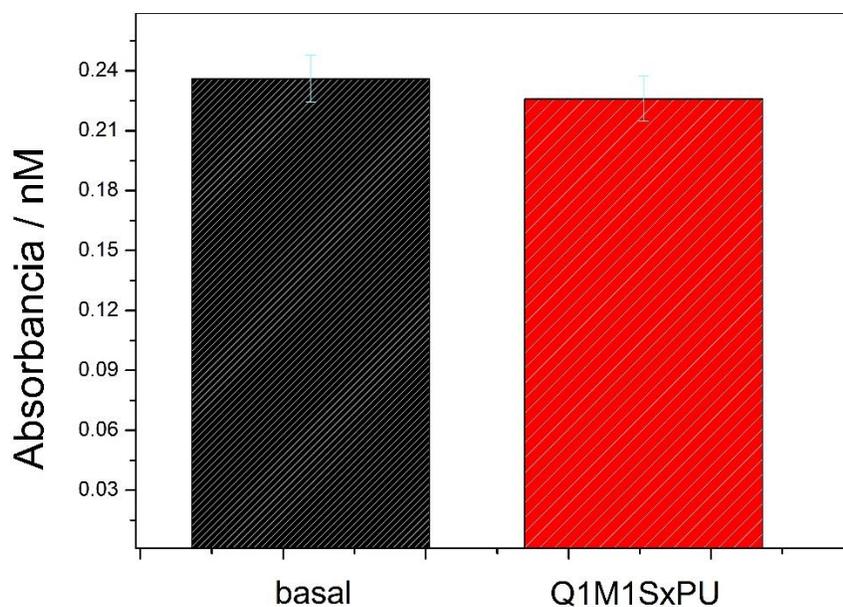


Figura 20. Absorbancias medidas en el ensayo de viabilidad celular del poliuretano.

Los resultados obtenidos en la caracterización del andamio sugieren que el poliuretano sintetizado tiene características morfológicas y mecánicas y viabilidad celular apropiadas para su aplicación en ingeniería de tejidos.

5. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos se concluye:

- Se realizó con éxito la síntesis de copolímeros Q-g-AEMA en diferentes disolventes mediante copolimerización por injerto inducido por radiación gamma, lo que se demostró con las técnicas de RMN, FTIR, ATG, ATD y DSC.
- Se determinó que, de los disolventes utilizados en la síntesis, el hexano propició el mayor grado de injerto.
- Se sintetizó el poliuretano QMS2PU a partir del copolímero QMS2, una resina alifática hidroxilada y 1,4-diisocianobutano; las técnicas de FTIR, SEM y micro-CT permitieron demostrar que se obtuvieron andamios tridimensionales de este material.
- Se realizaron propuestas de los mecanismos de reacción del injerto de AEMA en quitosano y de la síntesis del poliuretano, basados en la información de las técnicas espectroscópicas utilizadas.
- El poliuretano obtenido presentó propiedades morfológicas, porosidad, interconectividad y citotoxicidad adecuadas para su uso en ingeniería de tejidos.

Anexo I – Lixiviación de partículas⁵¹

Este método para la fabricación de andamios porosos consiste en usar partículas sólidas o semisólidas como “plantillas” para formar los poros y se puede realizar de dos maneras:

- 1) A una disolución del polímero se mezcla con las partículas del porógeno y la se coloca en un molde; posteriormente, se retira el disolvente por evaporación o liofilización y el compuesto remanente se lava con un disolvente en el que únicamente las partículas son solubles.
- 2) El porógeno se mezcla con los reactivos con los que se sintetizarán los andamios y, después de la reacción, es removido con un disolvente selectivo. Esta técnica es recurrente en la síntesis de andamios de poliuretanos.

Las ventajas más relevantes de este proceso son el buen control de la cantidad, la interconectividad y el tamaño de los poros, que dependen de la concentración y el tamaño de las partículas del porógeno. Por ejemplo, un alto grado de interconectividad se favorece al aumentar la concentración de las partículas. Por otro lado, la desventaja más notable es que si los disolventes no se remueven por completo, la viabilidad celular del material obtenido puede verse afectada

Anexo II – Generalidades de RMN en estado sólido^{52, 53. 54}

La principal dificultad de la aplicación de la RMN a las muestras sólidas es que los espectros muestran líneas muy anchas debido a dos contribuciones principales, la interacción dipolar entre los espines nucleares y la anisotropía del desplazamiento químico; esto dificulta su interpretación y reduce la información que puede obtenerse mediante los mismos.

La *interacción dipolar* puede darse entre núcleos iguales (homonuclear) o diferentes (heteronuclear) y, resulta de la interacción de un espín nuclear con el campo magnético generado por otro de ellos y viceversa. Por otro lado, cuando se registra el espectro de RMN de una muestra sólida, las señales de los desplazamientos químicos cambian según gire ésta en relación al campo magnético; esto se debe a que el apantallamiento de los núcleos varía, de modo que el desplazamiento se vuelve dependiente de la orientación del núcleo hacia el campo magnético. La zona de frecuencia en la que pueden observarse los desplazamientos es llamada *anisotropía del desplazamiento químico*.

Por fortuna, existen técnicas que permiten reducir el ancho de línea; una de ellas es el *giro en ángulo mágico* (MAS, del inglés Magic Angle Spinning). La interacción dipolo-dipolo y la anisotropía tienen una dependencia angular de la forma $1 - 3\cos^2 \theta$, donde θ es el ángulo entre el eje de la molécula y el campo magnético aplicado; cuando su valor es de 57.74° , $1 - 3\cos^2 \theta = 0$. En la técnica, la muestra gira rápidamente en el ángulo mágico bajo el campo magnético, de modo que los efectos mencionados promedian un valor de 0.

Muchos núcleos interesantes para el análisis químico se caracterizan por su baja abundancia natural así como por pequeñas constantes giromagnéticas y tiempos de relajación muy largos, lo que hace que la sensibilidad del experimento de RMN sea muy baja. Una técnica esencial para aumentar esta sensibilidad es la *polarización cruzada* (CP, del inglés Cross Polarization), que consiste en transferir polarización de núcleos abundantes con constantes giromagnéticas altas, como los protones, a núcleos como ^{13}C o ^{15}N isotópicamente escasos

7. Referencias

1. Jasso Gastinel, C.F., Soltero Martínez, J.F.A. & Mendizábal, E. (2017). 1 – Introduction: Modifiable Characteristics and Applications. En C.F. Jasso Gastinel & J.M. Kenny (Eds.) *Modification of Polymers Properties*, (p. 1). EUA: William Andrew Publishing.
2. Kalia, S., Sabaa, M.W. & Kango, S. (2013). Polymer Grafting: A Versatile Means to Modify the Polysaccharides. En S. Kalia & M.W. Sabaa (Eds.) *Polysaccharide Based Graft Copolymers* (pp. 2, 6). Alemania: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
3. Bhattacharya, A. & Misra, B.N. (2004). Grafting: a versatile means to modify polymers: Techniques, factors and application. *Progress in Polymer Science*, 29(8), pp. 767-814.
4. Cheremisinoff, N. P. (2001). *Condensed Encyclopedia of Polymer Engineering Terms*, (p. 69, 70). EUA: Elsevier.
5. Pino Ramos, V.H., Meléndez Ortiz, H.I., Ramos Ballesteros, A. & Bucio, E. (2018). Chapter 6 - Radiation Grafting of Biopolymers and Synthetic Polymers: Synthesis and Biomedical Applications. En V.K. Thakur (Ed.) *Biopolymer Grafting: Applications*, (p.224). EUA: Elsevier.
6. Pino Ramos, V.H., Ramos Ballesteros, A., López Saucedo, F., López Barrigüete, J.E., Varca, G.H.C. & Bucio, E. (2016). Radiation Grafting for the Functionalization and Development of Smart Polymeric Materials. *Topics in Current Chemistry*, 374(5), pp. 1-28.
7. Nasef, M.M. & Hegazy, E.-S.A. (2004). Preparation and applications of ion exchange membranes by radiation-induced graft copolymerization of polar monomers onto non-polar films. *Progress in Polymer. Science*, 29(6), pp. 499-561.
8. Walo, M. (2017). Radiation-Induced Grafting. En Y. Sun & A. G. Chmielewski (Eds.) *Applications of Ionizing Radiation in Materials*

- Processing. Volume 1.*, (pp. 194, 195, 199-204). Polonia: Institute of Nuclear Chemistry and Technology.
9. Bhardwaj, Y., Tamada, M., Nho, Y.-C., Nasef, M. & Güven, O. (2014). *Harmonized Protocol for Radiation-Induced Grafting*. (p. 1). Austria: IAEA.
 10. Gargan, K., Kronfli, E. & Lovell, K.V. (1990). Pre-irradiation grafting of hydrophilic monomers onto polyethylene—I. The influence of homopolymerisation inhibitors. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry*, 36(6), pp. 757-761.
 11. Tomovska R., Agirre A., Veloso A. & Leiza J.R. (2014). Characterization Techniques for Polymeric Materials. En J. Reedijk (Ed.) *Elsevier Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, (pp. 2 - 6, 8). EUA: Elsevier.
 12. Wade, L.G. (2011). *Química Orgánica. Volumen 1.*, (7^a edición, pp. 561, 562). México: Pearson Educación.
 13. Wunderlich, B. (2001). Thermal Analysis. En *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, (2nd Edition, p. 9134-9141). EUA: Elsevier.
 14. Barroso Herrero, S., Gil Bercero, J. R. & Camacho López, A. M. (2010). *Introducción al conocimiento de los materiales y a sus aplicaciones*, (1^a Edición, p. 131). España: UNED.
 15. Müller, A. J. and Michell, R. M. (2016). Differential Scanning Calorimetry of Polymers. En Q. Guo (Ed.) *Polymer Morphology. Principles, Characterization, and Processing*, (pp. 72, 74). EUA: John Wiley & Sons, Inc.
 16. Bottom, R. (2008). Thermogravimetric Analysis. En P. Gabbot (Ed.) *Principles and Applications of Thermal Analysis*, (1st Edition, p. 88). India: Blackwell Publishing Ltd.
 17. Michler, G. H. and Lebek, W. (2016). Electron Microscopy of Polymers. En Q. Guo (Ed.) *Polymer Morphology. Principles, Characterization, and Processing*, (p. 37). EUA: John Wiley & Sons, Inc.

18. Carlberg, D. M. (2004). *Cleanroom microbiology for the non-microbiologist*. (p. 36). EUA: CRC Press.
19. Bertoldi, S., Farè, S. & Tanzi, M.C. (2011). Assessment of scaffold porosity: the new route of micro-CT. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics*, 9(3), pp. 165-175.
20. Arango Varela, S. S. (2012). *Técnicas celulares y moleculares II Simposio*, (p. 62). Colombia: Instituto Tecnológico Metropolitano.
21. Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), pp. 603 - 632.
22. Ramírez, M.Á., Rodríguez, A.T., Alfonso, L. y Peniche, C. (2010). La quitina y sus derivados, biopolímeros con potencialidades de aplicación agrícola. *Biotecnología Aplicada*, 27(4), pp. 262 - 269.
23. Kumar, M.N.V.R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), pp. 1–27.
24. Pokhrel, S., Yadav, P.N. & Adhikari, R. (2015). Applications of Chitin and Chitosan in Industry and Medical Science: A Review. *Nepal Journal of Science and Technology*, 16(1), pp. 99–104.
25. Rodríguez-Pedroso, A.T., Ramírez-Arrebato, M.A., Rivero-González, D., Bosquez-Molina, E., Barrera-Necha, L.L. & Bautista-Baños, S. (2009). Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(3), 307–317.
26. Zargar, V., Asghari, M. & Dashti, A. (2015). A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *ChemBioEng Reviews*, 2(3), pp. 204–226.
27. Mourya, V.K. & Inamdar, N.N. (2008). Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. *Reactive & Functional Polymers*, 68(6), pp. 1013–1051.
28. Sashiwa, H. & Aiba, S.-i. (2004). Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, 29(9), pp. 887–908.
29. Crini, G. & Badot, P.M. (2008). Application of chitosan, a natural

- aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. *Progress in Polymer Science*, 33(4), pp. 399-447.
30. Usman, A., Zia, K.M., Zuber, M., Tabasum, S., Rehman, S. & Zia, F. (2016). Chitin and chitosan based polyurethanes: A review of recent advances and prospective biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, pp. 630-645.
 31. Javaid, M.A., Khera, R.A., Zia, K.M., Saito, K., Bhatti, I.A. & Asghar, M. (2018). Synthesis and characterization of chitosan modified polyurethane bio-nanocomposites with biomedical potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, pp. 375-384.
 32. Jayakumar, R., Prabakaran, M., Kumar, P.T.S., Nair, S.V. & Tamura, H. (2011). Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, 29(3), pp. 322-337.
 33. Shi, G. Cai, Q., Wang, C., Lu, N. Wang, S. & Bei, J. (2002). Fabrication and biocompatibility of cell scaffolds of poly(L-lactic acid) and poly(L-lactic-co-glycolic acid). *Polymers for Advanced Technologies*, 13(3-4), pp. 227-232.
 34. Yang, J. *et al.* Fabrication and surface modification of macroporous poly (L -lactic acid) and poly (L -lactic- co -glycolic acid) (70 / 30) cell scaffolds for human skin fibroblast cell culture. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 62, 438–446 (2002).
 35. Thimm, B.W., Wechsler, O., Bohner, M., Müller, R. & Hofmann, S. (2013). *In Vitro* Ceramic Scaffold Mineralization: Comparison Between Histological and Micro-Computed Tomographical Analysis. *Annals of Biomedical Engineering*, 41(12), pp. 2666-2675.
 36. González Torres, M., Rodríguez Talavera, R., Vargas Muñoz, S., Carreón-Castro, M.D.P., Rivera Muñoz, E.M., Hernández Padrón, G. & Quintanilla Guerrero, F. (2015). Crystalline and spectroscopic characterization of poly(2-aminoethyl methacrylate hydrochloride) chains grafted onto poly[(R)-3-hydroxybutyric acid]. *Vibrational Spectroscopy*, 76, pp. 55-62.
 37. González Torres, M., Vargas Muñoz, S., Solís Rosales, S.G., Carreón-

- Castro, M.D.P., Esparza Muñoz, R.A., Olayo González, R., Estévez González, M. R., & Rodríguez Talavera, R. (2015). Radiation-induced graft polymerization of chitosan onto poly(3-hydroxybutyrate). *Carbohydrate Polymers*, 133, pp. 482-492.
38. De Angelis, A.A., Capitani, D. & Crescenzi, V. (1998). Synthesis and ^{13}C CP-MAS NMR Characterization of a New Chitosan-Based Polymeric Network. *Macromolecules*, 31(5), pp. 1595-1601.
39. Ríos Donato, N., Navarro Mendoza, R., Ávila Rodríguez, M. & Mendizábal Mijares, E. (2006). Obtención de sulfato de quitosano y su aplicación en el proceso de coagulación-floculación de suspensiones de Caolinita. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 7(3), pp. 145-161.
40. Van De Velde, K. & Kiekens, P. (2004). Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state ^{13}C NMR. *Carbohydrate Polymers*, 58(4), pp. 409–416.
41. Hernández Cocoltzi, H., Águila Almanza, E., Flores Agustín, O., Viveros Nava, E.L., Ramos Cassellis, E. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y Vacío*, 22(3), pp. 57–60.
42. Jiang, T. & Hu, P. (2001). Radiation-Induced Graft Polymerization of Isoprene onto Polyhydroxybutyrate. *Polymer Journal*, 33(9), pp. 647-653.
43. García, M.A., de la Paz, N., Castro, C., Rodríguez, J.L., Rapado, M., Zuluaga, R., Gañán, P. & Casariego, A. (2015). Effect of molecular weight reduction by gamma irradiation on the antioxidant capacity of chitosan from lobster shells. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(2), pp. 190-200.
44. Guo, C., Zhou, L. & Lv, J. (2013). Effects of expandable graphite and modified ammonium polyphosphate on the flame-retardant and mechanical properties of wood flour-polypropylene composites. *Polymer & Polymer Composites*, 21(7), pp. 449-456.
45. Moussout, H., Ahlafi, H., Aazza, M. & Bourakhouadar, M. (2016). Kinetics and mechanism of the thermal degradation of biopolymers chitin and

- chitosan using thermogravimetric analysis. *Polymer Degradation Stability*, 130, pp. 1-9.
46. Dhawade, P.P. & Jagtap, R.N. (2012). Characterization of the glass transition temperature of chitosan and its oligomers by temperature modulated differential scanning calorimetry. *Advances in Applied Science Research*, 3(3), pp. 1372-1382.
47. Dimonie, D., Dima, S.O. & Petrache, M. (2013). Influence of centrifugation on the molecular parameters of chitosan solubilized in weakly acidic aqueous solutions. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 8(4), pp. 1799-1809.
48. Gong, P., Zhang, L., Zhuang, L. & Lu, J. (1998). Synthesis and characterization of polyurethane-chitosan interpenetrating polymer networks. *Journal of Applied Polymer Science*, 68(8), pp. 1321–1329.
49. Kara, F., Aksoy, E.A., Yuksekdag, Z., Hasirci, N. & Aksoy, S. (2014). Synthesis and surface modification of polyurethanes with chitosan for antibacterial properties. *Carbohydrate Polymers*, 112, pp. 39-47.
50. Shih, C.-Y. & Huang, K.-S. (2003). Synthesis of a polyurethane-chitosan blended polymer and a compound process for shrink-proof and antimicrobial woolen fabrics. *Journal of Applied Polymer Science*, 88(9), pp. 2356-2363.
51. Prieto, E.M. & Guelcher, S.A. (2014). 5 – Tailoring properties of polymeric biomedical foams. En P.A. Netti (Ed.) *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications*, (p. 141). Reino Unido: Elsevier.
52. Atkins, P. & de Paula, J. (2008). *Química Física*, (8^a edición, pp. 548, 549), Argentina: Médica Panamericana.
53. Elguero, J., Limbach, H-H., Aguilar-Parrilla, F., Claramunt, R.M. & López, C. (1995). Resonancia magnética nuclear de alta resolución en estado sólido: un auxiliar de la cristalografía. En F. Hernández Cano, C. Foces-Foces & M. Martínez-Ripoll (Eds.) *Cristalografía*, (pp. 287,288). España: CSIC.
54. Rennie, R. & Law, J. (2016). *A dictionary of chemistry*, (p. 340). Reino Unido: Oxford University Press.