

# PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MEZCLAS BINARIAS CON POSIBLES APLICACIONES BIOMÉDICAS.

<sup>1</sup>Cardoso, J., <sup>1</sup>Aguilar, M. A., <sup>1</sup>Gracida, J., <sup>1</sup>Dávalos, K., <sup>1</sup>Vázquez, J.,  
<sup>2</sup>Cortés, L., <sup>2</sup>Hernández, F., <sup>1</sup>Flores, G., <sup>2</sup>Pérez, F.

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV)

## INTRODUCCIÓN.

El empleo de polímeros en el ámbito biomédico es muy vasto debido a que de la amplia gama de propiedades que pueden tener estos materiales pueden seleccionarse aquéllas que satisfagan los requisitos de un dispositivo destinado a restaurar o reemplazar tejidos biológicos. Los polímeros con mayor afinidad biológica son los provenientes de organismos vivos pero la mayoría de las veces su obtención resulta muy costosa por lo que se han desarrollado diversos mecanismos que la hagan más accesible sin alterar sus características particulares. Una de esas estrategias es la producción de mezclas de polímeros microbianos y sintéticos.

En este trabajo se presentan cuatro mezclas preparadas con diferentes proporciones de un polímero sintético, el poli(2-hidroxietilmetacrilato) (PHEMA) y otro microbiano, el poli(hidroxibutirato-cohidroxivalerato), sus propiedades mecánicas así como los resultados de las pruebas de biodegradación y biocompatibilidad de las mismas.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

**Síntesis de polímeros microbianos.** La síntesis de los homo y copolímeros derivados de los ácidos hidroxibutírico (HB) e hidroxivalérico (HV) se realizaron empleando a la bacteria *Ralstonia eutropha* para las fermentaciones. Para sintetizar el copolímero PHB-HV las fermentaciones se llevaron a cabo en lote alimentado con un medio que contenía ácido butírico como fuente de carbono sin limitación de nitrógeno. En la fase de alimentación se empleó un medio con limitación de nitrógeno, conteniendo además 2 fuentes de carbono: ácido butírico y ácido valérico. Las condiciones de fermentación fueron: 30 °C, pH 7, agitación de 550 rpm, velocidad de alimentación 50 mL/h, volumen inicial 3.5 L, volumen final 5.0 L. El polímero libre de células se liofilizó y se purificó (Gracida, *et al.*, 2002).

**Síntesis del polímero sintético PHEMA.** La polimerización radicalica de los monómeros metacrílicos se realizó en solución, en una atmósfera de nitrógeno y empleando al AIBN como iniciador. La temperatura de la reacción fue de 60 °C y su duración fue de 24 h. El polímero resultante en cada ocasión fue purificado por disolución del material y precipitado en un no disolvente; posteriormente se filtró y secó en un horno de vacío a una temperatura que no excedió de 50 °C.

**Preparación de las mezclas binarias PHEMA:PHB-HV.** Las mezclas se realizaron por “casting”, el porcentaje de unidades HV en el copolímero empleado fue de 21 % mol y el mezclado con el PHEMA se realizó por solución al 4 %, empleando cloroformo como disolvente. Antes de proceder a su caracterización y a los experimentos de degradación y de toxicidad, los materiales así compuestos fueron sometidos a secado en vacío a 60 °C por 24 h para eliminar el disolvente residual.

**Caracterización de las mezclas binarias PHEMA:PHB-HV.** Se analizaron mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN), de ( $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$ ), calorimetría diferencial de barrido (DSC), Difracción de Rayos X (XRD) y Espectroscopia de FT-IR.

**Prueba de biodegradación.** Se empleó la metodología establecida por la “American Standard Test Methods” ASTM G21-90 que establece el uso de cinco hongos inoculados de manera simultánea sobre el material de estudio: *Trichoderma virens* (ATCC 9645), *Penicillium funiculosum* (ATCC 11797), *Chaetomium globosum* (ATCC 6205), *Aspergillus niger* (ATCC 9642), *Aureobasidium pullulans* (ATCC 15233).

**Pruebas de biocompatibilidad in vitro.** Se empleó como modelo experimental el cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica y las muestras sanguíneas se obtuvieron de 7 donadores adultos, sanos, 4 hombres y 3 mujeres de edad promedio de 25 años. Las células se expusieron durante las últimas 48 horas del cultivo a las mezclas binarias así como a cada uno de sus componentes por separado; al lote testigo no se le expuso a ningún material. Los biomarcadores de daño que se registraron fueron de citotoxicidad (índice mitótico e índice de replicación), clastogenicidad (alteraciones en el número y la estructura de los cromosomas) y genotoxicidad (rompimientos sencillos en la cadena de ADN e inducción de muerte celular *apoptosis* mediante citometría de flujo). Además, se realizó una prueba de mitogenicidad del copolímero PHB-HV.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Mezclas binarias PHEMA:PHB-HV.** El intervalo de composiciones realizadas fue de 0-70 % de PHEMA en el copolímero biológico PHBHV. Cuatro fueron las mezclas PHEMA:PHB-HV probadas: 20:80, 30:70, 50:50 y 70:30.

**Caracterización de las mezclas binarias PHEMA:PHB-HV.** Las señales obtenidas en los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  muestran los desplazamientos esperados, se verificaron las señales obtenidas y la integración de los protones se aproxima a la teórica.

Los termogramas de las muestras no permitieron observar la temperatura de transición vítrea del PHEMA, debido a que la temperatura de cristalización de PHBHV y la de transición vítrea de PHEMA se encuentran superpuestas. No se registró ningún desplazamiento de la Tg de PHBHV, lo cual sería un indicativo de un mezclado entre ambos polímeros.

Con el análisis de Rayos X se comprobó que al mezclar el PHEMA y PHBHV no hubo miscibilidad ya que no existieron cambios en la cristalinidad, la cual debía bajar en porcentaje en caso de haber miscibilidad.

En los espectros FT-IR, las señales más importantes observadas son las siguientes: en  $3420\text{ cm}^{-1}$  la señal correspondiente a la vibración del -OH de PHEMA, una señal a  $2975\text{ cm}^{-1}$  asociada al grupo  $\text{CH}_3$  correspondiente a la vibración fuera del plano; en  $2934\text{ cm}^{-1}$  y en  $2840\text{ cm}^{-1}$  las vibraciones simétricas y asimétricas para los  $\text{CH}_2$  y, en  $1281\text{ cm}^{-1}$ , para la vibración del C-O.

**Prueba de biodegradación.** Los experimentos de biodegradación constataron que el PHEMA no se biodegrada sino únicamente es separado de la matriz polimérica al degradarse el copolímero biológico en la mezcla. Como era de esperarse el tiempo de biodegradación “aparente” de las mezclas resultó inversamente proporcional a la cantidad de PHBHV presente en las mezclas. De las especies de hongos probadas *P. funiculosum* presenta mayor actividad degradadora. Esto último se comprobó empleando microscopía electrónica de barrido con la que también se pudo observar que la degradación ocurrió en la superficie de las mezclas, tal y como ha sido publicado previamente para fenómenos de esta naturaleza (Gracida, 2004).

**Pruebas de biocompatibilidad *in vitro*.** El análisis del índice mitótico (IM) promedio mostró que PHEMA disminuye el IM a la mitad con respecto al testigo ( $\chi^2$ ;  $p < 0.05$ ). El efecto de las mezclas es contrario al del polímero sintético solo pues el IM se incrementa de manera significativa excepto en los cultivos expuestos a la mezcla 70:30. En virtud de que el aumento es proporcional al contenido del copolímero microbiano y de que las células que proliferan en el cultivo son linfocitos T, que participan en la respuesta celular inmune, se pensó que el PHB-HV podría haber estimulado la proliferación celular como ocurre en el organismo ante la presencia de un antígeno.

No obstante, al cultivar linfocitos no estimulados en presencia de este copolímero las células no ingresaron al ciclo celular por lo que se descartó el efecto mitogénico del polímero bacteriano. Es posible que el incremento significativo del IM provocado por la mayoría de las mezclas sea debido a un efecto potenciador del PHB-HV sobre el agente mitogénico que normalmente se emplea para el cultivo de linfocitos, la fitohemaglutinina.

El efecto del material sobre el índice de replicación (IR) se determinó empleando sólo la mezcla binaria 70:30, que es la única que no alteró significativamente al IM, encontrándose que tampoco afecta la cinética de proliferación celular.

Con relación a la alteración del número de cromosomas y su estructura cromosómica se observó que ninguna de las mezclas induce cambio significativo en estos dos parámetros.

Los datos obtenidos de la electroforesis unicelular o ensayo cometa indican que la exposición de las células a los polímeros incrementa en alrededor del 28 % la proporción de células dañadas ( $\chi^2$ ;  $p < 0.05$ ). El daño al ADN inducido por el PHEMA, en términos de longitud promedio de la migración electroforética, es 76 % mayor que el testigo mientras que, cuando se encuentra mezclado con el PHB-HV, el incremento es de sólo 49 %. Estos datos muestran que los materiales probados tienen efecto genotóxico pero, al observar que el valor máximo de la longitud promedio no excede de 7  $\mu\text{m}$  y que en la distribución de la longitud de la migración en todos los lotes, excepto PHEMA, más del 94 % quedan incluidos en el intervalo de menor longitud, puede concluirse que el daño inducido al ADN por estos materiales es mínimo. Incluso, al comparar la magnitud del daño inducido por PHEMA con otros agentes químicos que provocan longitudes promedio de 60  $\mu\text{m}$  o más en modelos experimentales *in vitro* (1, 2), también resulta poco significativo.

Otro marcador de toxicidad es la apoptosis y, para efectos de este trabajo, se aplicaron tres métodos de detección de este proceso que conduce a la muerte celular: la translocación de la fosfatidilserina, la cuantificación de células con cantidad diploide de ADN y la fragmentación del ADN mediante el análisis cualitativo de electroforesis en gel de agarosa. Únicamente se sometieron a prueba la mezcla 70:30, el PHEMA y el PHB-HV. Se encontró que ninguno de los tres materiales afectó la fracción de células apoptóticas ni la de células diploides, señal de que no se activó significativamente el proceso de apoptosis. La electroforesis en gel de agarosa reveló que en todas las muestras hubo fragmentos de ADN de bajo peso molecular, que indican que se activó el proceso de muerte celular programada, pero la intensidad de la fracción apoptótica de cada lote es distinta siendo la más elevada la del lote testigo seguida por la del lote expuesto al copolímero bacteriano, a la mezcla 70:30 y, finalmente, al PHEMA. Estas observaciones apoyan el hecho de que ni la mezcla ni sus componentes por sí mismos desencadenan el proceso apoptótico.

## **CONCLUSIONES**

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación podemos decir que de las mezclas

binarias PHEMA:PHB-HV sintetizadas, la más prometedora es la 70:30 ya que, además de que su síntesis es factible, no es citotóxica ni genotóxica. Entre las posibles aplicaciones que pudieran dársele se encuentran: componentes de prótesis o dispositivos clínicos en contacto con el ambiente fisiológico transportadores de fármacos y para la generación de parches.

### **REFERENCIAS**

1. Blasiak, J., Kowalik, J. A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium. *Mutation Research* 469: 135-145 (2000).
2. Gracida-Rodriguez, J., Alva-Flores, J., Cardoso, J., Pérez Guevara, F. Synthesis and characterization of PHBHV copolymer produced in sequential feeding fed batch cultures of *Ralstonia eutropha*. *International Journal of Polymeric Materials* 51:607 (2002).
3. Gracida, J., Alba, J., Cardoso, J., Perez-Guevara, F. Studies of biodegradation of binary blends of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBHV) with poly(2-hydroxyethylmetacrilate) (PHEMA). *Polymer degradation and stability* 83:247-253 (2004).
4. Guadarrama, H. G. Cito y genotoxicidad del ion plata en cultivo de linfocitos humanos: índice mitótico y ensayo cometa. Tesis de Licenciatura en Biología. Fac. de Ciencias, UNAM. (2000).