

SÍNTESIS Y BIODEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE COMPOSITOS DE POLIURETANO POROSO/HIDROXIAPATITA.

N. A. RANGEL VÁZQUEZ^{1*}; H. E. DE ALVA SALAZAR¹; J. ROMERO GARCÍA²;
J. L. RIVERA ARMENTA¹.

1. División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Ciudad Madero. Juventino Rosas y Jesús Urueta S/N Col. Los Mangos, CP 89440, Cd. Madero, Tamaulipas. norma_rangel79@hotmail.com, hde_alva@hotmail.com, jlriveraarmenta@yahoo.com
2. Centro de Investigación en Química Aplicada. Blvd. Enrique Reyna Hermosillo #140, Saltillo, Coahuila. jromero@ciqua.mx

RESUMEN.

En este trabajo de investigación se estudió la obtención de compositos mezclados y soportados de poliuretano poroso/hidroxiapatita, debido a la excelente biocompatibilidad de los poliuretanos y en combinación con la hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, el cual es el principal componente inorgánico de los tejidos óseos, para la regeneración de tejido óseo. También se estudió la biodegradación enzimática de los compositos mezclados y soportados, debido a que dentro del desarrollo de materiales biocompatibles, las aplicaciones ortopédicas es un área para el desarrollo de nuevos compositos, sin embargo, estos materiales están sujetos a la corrosión y desgaste debido a la diferencia de propiedades mecánicas entre el composito y el hueso, además de que el implante se debilita. Además, es un hecho conocido que la biodegradación o reabsorción de un material *in vivo* está constituida por un proceso bastante complejo, donde interactúan mecanismos fisicoquímicos con mecanismos de tipo biológico a través de procesos mediados por proteínas y células, y por lo tanto, la biodegradación del material no depende exclusivamente de las propiedades fisicoquímicas del mismo.

INTRODUCCIÓN.

Las enzimas, en los sistemas biológicos constituyen las bases de las complejas y variadas reacciones que caracterizan los fenómenos vitales. En la ingeniería médica y tecnología farmacéutica el propósito de la degradación de los polímeros es muy importante, debido a que cuando permanecen cierto tiempo dentro del organismo, estos son degradados por el medio fisiológico al que son expuestos [1]. En este medio fisiológico solo se puede degradar mediante hidrólisis y oxidación de los polímeros. La hidrólisis se produce cuando el polímero tiene principalmente enlaces inestables y algún grado de hidrofiliidad, existen dos tipos de mecanismo para la hidrólisis, el más importante se produce en el enlace éster para obtener dos cadenas más cortas y la otra opción es la formación del grupo uretano. Mientras que la oxidación se lleva a cabo en un pH de 7.4 así como una temperatura de 37°C aproximadamente [2-5].

Desde hace décadas es conocido que el poliuretano (PU) es susceptible a la degradación. Desafortunadamente, no existen muchas investigaciones referentes a los mecanismos de las enzimas o bioquímicos en los estudios de la degradación de poliuretanos. Los PU's se diferencian de otras macromoléculas en que sus características fisicoquímicas dependen de la clase de polioles y poliisocianatos usados como materias primas para su síntesis; por eso su dificultad para comparar las actividades de degradación de diferentes poliuretanos biodegradables por microorganismos. El proceso de degradación puede ser dividido a groso modo dentro de la degradación de los enlaces uretano y la degradación del segmento polioliol, el cual es el mayor constituyente de los PU's y la degradación del PU es influenciada por la estructura química del segmento polioliol [6-8].

SECCIÓN EXPERIMENTAL.

➤ Síntesis del poliuretano poroso.

En un reactor, se disolvieron en 1,4-dioxano, 20 g de policaprolactona diol (PM de 1250 gr/mol) y 3.08 gramos de policaprolactona triol (PM de 900 g/mol). Una vez disueltos estos reactivos se agregó 4.26 ml de 1,6-hexametilen diisocianato, se agrega 1.0% de dilaurato de dibutilestano. Para obtener la separación de fases se adiciono agua.

La solución homogénea fue liofilizada a -15 °C durante 72 horas a una presión de 0.30 milibares; el polímero fue curado a una temperatura de 60 °C y una atmósfera de nitrógeno durante 24 horas.

➤ Hidroxiapatita (HA).

Se preparo una suspensión de 0.5 M de hidróxido de calcio a la cual se le agrego 1 litro de una solución 0.3 M de ácido fosfórico con un flujo de 2 ml/min. y agitación constante a una temperatura de 42°C. El precipitado obtenido fue filtrado y secado a 100°C durante 48 horas. La solución fue controlada a un pH de 11 a 12 mediante la adición de hidróxido de amonio. Es importante obtener la HA con tamaños nanométricos y para conseguir esto fue necesario utilizar poliácido acrílico (PAA) como agente dispersante [9-10].

➤ Síntesis de los compositos.

Para preparar los compositos mezclados, la HA se agrego después de mezclar cada uno de los reactivos del PU poroso seguido de un enfriamiento, una liofilización y un curado del composito para que finalmente fueran realizadas las caracterizaciones correspondientes del composito sintetizado. En la tabla 1 se muestra el diseño de experimentos para la síntesis de los compositos mezclados y soportados, en donde, el 1,4-dioxano, el 1,6-hexametilen diisocianato y el agua son mantenidos constantes a 50 ml, 4.26 ml y 0.54 ml respectivamente. El objetivo principal de la síntesis de los compositos soportados fue que la superficie del PU soporte las partículas de HA y con la formación de la HA biológica mediante la biomineralización a partir del fluido fisiológico simulado (FFS) exista un exceso de HA en la superficie y por lo tanto el composito incrementa la bioactividad.

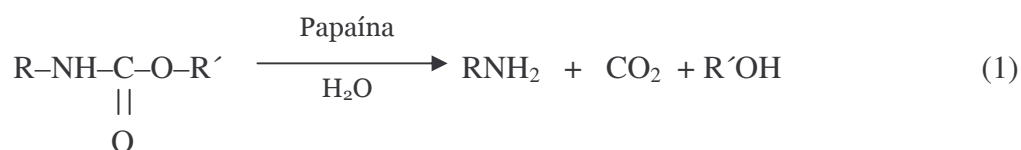
➤ Pruebas de biodegradación enzimática.

El procedimiento a emplear para esta prueba consistió primeramente en preparar las soluciones buffer de pH entre 6 y 8 con los reactivos KH_2PO_4 y K_2HPO_4 , se realizo pesando las cantidades de los reactivos en base a una solución 0.1 M para los pH's antes mencionados y el volumen de solución a preparar. Las cantidades de las sales pesadas se agregaron a un matraz volumétrico y se afora con agua destilada. Después se verifico el pH deseado de cada solución por medio de un potenciómetro, el cual fue previamente calibrado con soluciones buffer de pH 4 y 7 respectivamente, antes de tomar la lectura de las soluciones a medir. Una vez preparadas las soluciones buffer se adiciono cada enzima en concentraciones de 0.1% de la enzima especificada. Los compositos de 0.1 g se colocaron en viales previamente esterilizados, agregando posteriormente 15 ml de solución buffer. Posteriormente se incubaron los viales a temperaturas que se muestran en la tabla 2 el tiempo de incubación fue de 15 días. Posteriormente las muestras fueron lavadas y secadas para después realizar las pruebas de caracterización para determinar la biodegradación sufrida [6].

RESULTADOS Y DISCUSIONES.

1.- Enzima Papaína.

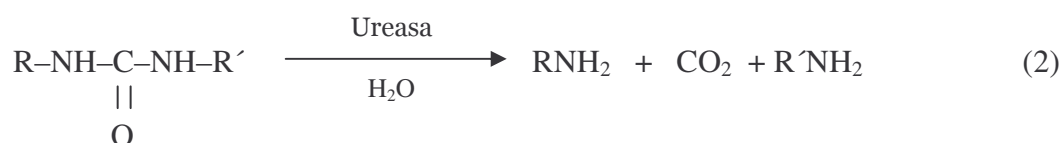
La enzima papaína se relaciona principalmente con las células responsables de la inflamación, y se caracteriza por que actúa en los grupos uretano, urea, anillo bencénico y grupos amida del uretano cuyas bandas aparecen aproximadamente a 1732 cm^{-1} , 1311 cm^{-1} y 1218 cm^{-1} respectivamente, además de que el mecanismo de acción de la enzima es propuesto por la reacción 1 de hidrólisis [2-3,11].



En la figura 1 se presentan los espectros de infrarrojo del composito mezclado y soportado con 30% de HA sometidos a la acción de la papaína y a una solución buffer de pH 6 (sin enzima), en donde se muestran las bandas de los productos de la degradación, de 1310 a 1240 cm^{-1} del estiramiento O-C-O del COOH, de 1100 a 1000 cm^{-1} debido al estiramiento del enlace C-O-C del uretano. En la figura 2 se presentan los resultados obtenidos de la pérdida en peso mediante la acción de la enzima papaína en el composito mezclado y soportado con 30% de HA con la solución buffer de pH 6, en donde se observa que después de 15 días el mayor efecto de la enzima es en el composito mezclado con una pérdida en peso del 4.2%, mientras que el composito soportado solo se degrada 2.4% en peso.

2.- Enzima Ureasa.

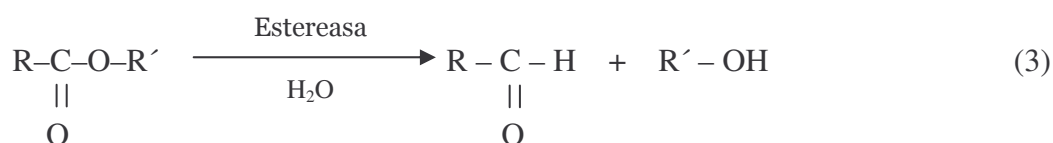
La enzima ureasa se encuentra en los leucocitos, y se caracteriza por que afecta en los enlaces de la urea y grupos amida del uretano cuyas bandas aparecen aproximadamente a 1653, 1550 y 1246 cm^{-1} , además de que el mecanismo de acción de la enzima es propuesto por la reacción 2 de hidrólisis [11].



En cuanto a las muestras sometidas a la acción de la ureasa, en la figura 3 se muestran los espectros de infrarrojo correspondientes al composito mezclado y soportado con 30% de HA y con solución buffer de pH 8 (sin enzima), en donde se aprecia las bandas características de los productos de la degradación de 1397 a 1237 cm^{-1} del estiramiento O-C-O del COOH, de 1177 a 1084 cm^{-1} debido al estiramiento del enlace C-O-C del uretano que se atribuyen a la biodegradación. La segunda enzima utilizada en esta investigación fue la ureasa y una solución buffer de pH 8, los resultados obtenidos de la biodegradación del composito mezclado y soportado con 30% de HA se muestran en la figura 4 en donde se puede observar que la tendencia fue de aumentar la biodegradación conforme al tiempo de acción de la enzima. También se observa que los porcentajes de pérdida en peso para el composito de 30% HA fue de 3% y para el composito soportado de 2.1% respectivamente.

3.- Enzima Esterasa.

La enzima esterasa se caracteriza por que afecta en los enlaces ésteres del poliuretano, además de que el mecanismo de acción de la enzima es propuesto por la reacción 3.



En la figura 5 se muestra el espectro de infrarrojo correspondiente al composito mezclado y soportado con 30% de HA sometido a la enzima esterasa y a la solución buffer de pH 8, en donde se presentan las bandas atribuidas a la degradación a 1410 cm^{-1} debido al estiramiento del COO, de 1350 a 1300 cm^{-1} del al estiramiento (O—C-O) del COOH, de 1275 a 1250 cm^{-1} del enlace C-O del CH₂-OH, a 1174 cm^{-1} del (O-C-O) del CO-O-CH₂ y finalmente a 637 cm^{-1} por el estiramiento C-O. En la figura 6, se observan los porcentajes de pérdida en peso del composito mezclado y soportado con 30% de HA al ser sometidos a la acción de la esterasa, en donde se observa que los compositos se empiezan estabilizar a los 13 días, además los porcentajes de pérdida en peso del composito mezclado de 30% con la acción de la enzima y para el composito soportado fueron de 2% y 1.7% respectivamente, ya que esta enzima actúa principalmente en los enlaces ésteres así como C-C y C-N del PU.

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1.- Diseño de experimentos para los compositos mezclados y soportados.

COMPOSITOS	HA (%peso)	PAA (g)
1	15	0.1
2	15	0.3
3	15	0.6
4	30	0.1
5	30	0.3
6	30	0.6
7	45	0.1
8	45	0.3
9	45	0.6

Tabla 2.- Características de las enzimas.

NOMBRE COMERCIAL.	ENZIMA	FUENTE	TEMPERATURA DE REACCIÓN (°C)	pH ÓPTIMO
Propain (papaína)	Proteasa	Látex de papaya	60	6
Ureasa	Hidrolasa	Habas	25	8
Esterasa	Hidrolasa	Hígado de cerdo	25	8

ÍNDICE DE FIGURAS.

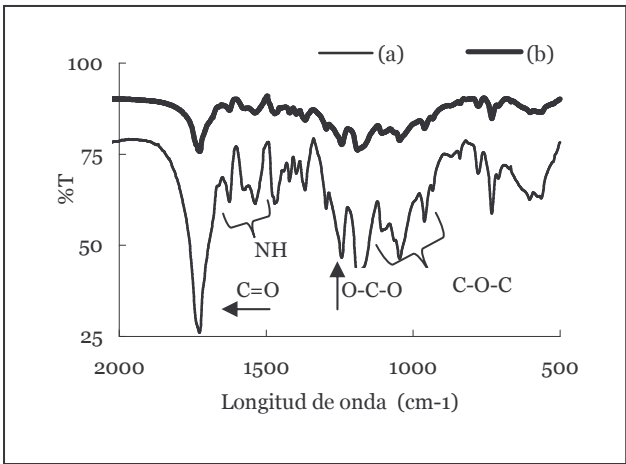


Figura 1.- Espectros de infrarrojo de los compositos (a) mezclados y (b) soportado con 30% de HA y la enzima papaína.

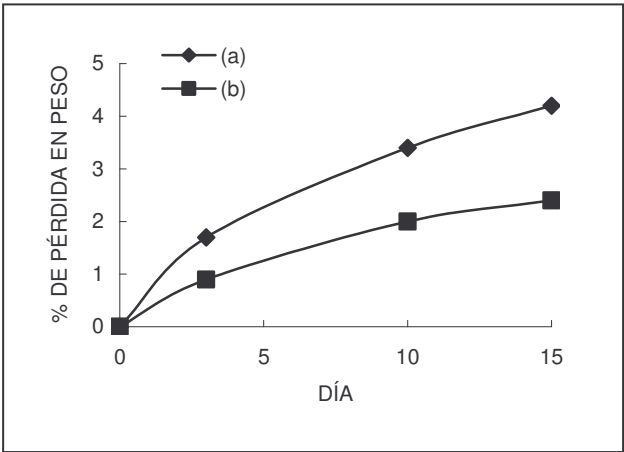


Figura 2.- Porcentajes de pérdida en peso de los compositos (a) mezclado y (b) soportado con 30% de HA y la enzima papaína.

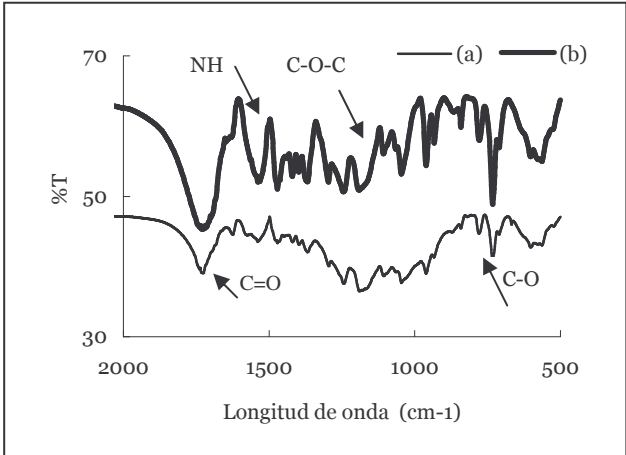


Figura 3.- Espectros de infrarrojo de los compositos (a) mezclados y (b) soportado con 30% de HA y la enzima ureasa.

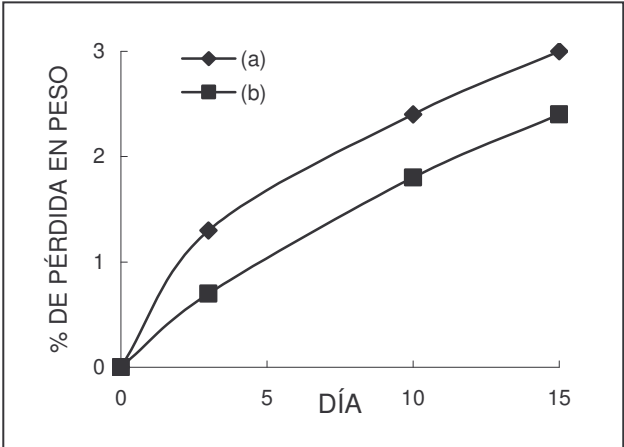


Figura 4.- Porcentajes de pérdida en peso de los compositos (a) mezclado y (b) soportado con 30% de HA y la enzima ureasa.

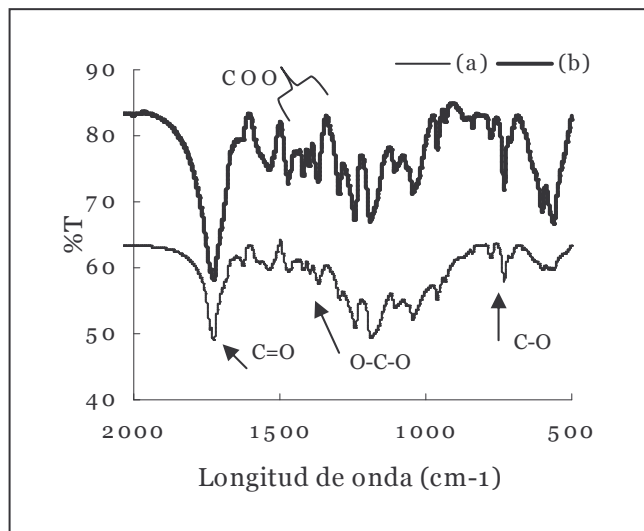


Figura 5.- Espectros de infrarrojo de los composites (a) mezclados y (b) soportado con 30% de HA y la enzima esterasa.

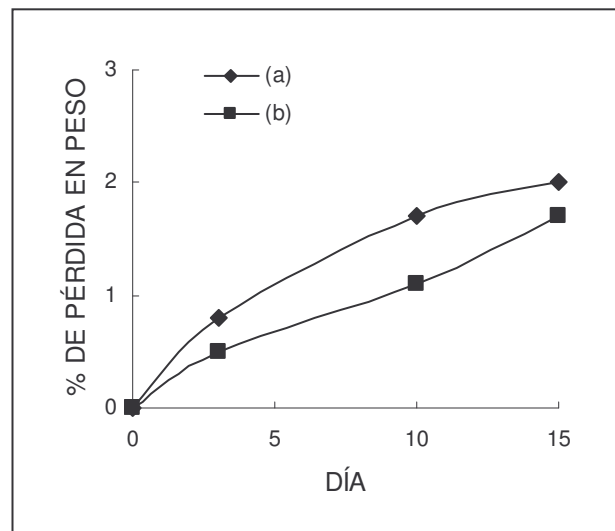


Figura 6.- Porcentajes de pérdida en peso de los composites (a) mezclado y (b) soportado con 30% de HA y la enzima esterasa.

CONCLUSIONES.

El análisis y diseño de los experimentos con el software Minitab permite la disminución en la síntesis de composites (mezclados y soportados). Los espectros de infrarrojo del composite mezclado y del soportado con 30% de hidroxiapatita mediante la acción de las enzimas papaína, esterasa y ureasa concuerdan con los resultados obtenidos por el porcentaje en pérdida en peso. Se determinó por FTIR y porcentaje de pérdida en peso que los composites (mezclado y soportado) son más susceptibles a ser biodegradados mediante la enzima papaína (4.2% y 2.4% respectivamente) debido a que el peso molecular de la enzima produce que se difunda en el composite y produce un mayor efecto en comparación con las otras enzimas. Los porcentajes de biodegradación son aceptables debido a que en las aplicaciones biomédicas las prótesis deben ser resistentes al ataque enzimático que sufren en el cuerpo humano. En este estudio se observó que los composites de poliuretano/hidroxiapatita (mezclado y soportado) son vulnerables a las reacciones de hidrólisis del enlace éster de los composites.

AGRADECIMIENTOS.

A la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Ciudad Madero y al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) de Saltillo, Coahuila por las facilidades otorgadas.

BIBLIOGRAFÍA.

- [1] D. F. Williams; *Journal Materials Science*; 1982, 17, 1233-1246.
- [2] R. Smith and D. F. Williams; *Journal Materials. Science. Lett*; 1985, 4, 547.
- [3] R. Smith; C. Oliver and D. F. Williams; *Journal Biomedical Materials. Res*; 1987, 21, 991.
- [4] Idem; *Ibid*; 1987, 21, 1149.
- [5] C. S. Schollenberger and F. D. Stewart; *Journal Elastoplast*; 1971, 3, 28.
- [6] R. E. Zavala; "Síntesis de Poliuretano a Partir de Aceites Naturales", Tesis de doctorado, DEPI-ITCM, 2003.
- [7] J. Méndez; "Desarrollo de Nuevos Biomateriales Para Aplicaciones Dentales y Ortopédicas", Tesis de Doctorado, CIMAV-CIQA, 1999.
- [8] H. C. Ki and O. Park; *Polymer*, 2001, 42, 1849-1861.
- [9] L. M. Jonch; C. G. Grobelaar; *Clinic Materials*, 1990, 6, 323.
- [10] I. M. Brook, G. T. Craig, D. J. Lamb; *Clinics Materials*, 1991, 12, 179.
- [11] S. K. Phua, J. M. Anderson, and A. Hiltner; *Journal of Biomedical Materials Research*; 1987, 21, 231-246.