

## **ANÁLISIS DE FTIR EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y MODELOS MATEMÁTICOS DE MATERIALES COMPUESTOS DE POLIURETANO POROSO/HIDROXIAPATITA**

**Norma A. Rangel Vázquez<sup>1\*</sup>; Hugo E. De Alva Salazar<sup>2</sup>; Jorge Romero García<sup>3</sup>; Edgar García-Hernández<sup>4</sup>; José L. Rivera Armenta<sup>2</sup>**

1) Instituto Tecnológico de Querétaro. Avenida Tecnológico Esquina Mariano Escobedo S/N Col. Centro, CP 76000, Querétaro, Querétaro, México. Correo electrónico: norma\_rangel79@yahoo.com.mx

2) 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, Ciudad Madero, Tamaulipas, México.

3) Centro de Investigación en Química Aplicada. Blvd. Enrique Reyna Hermosillo #140, Saltillo, Coahuila, México.

4) División de Estudios de Posgrado e Investigación y Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica del Instituto Tecnológico de Záratepec. Calzada Instituto Tecnológico 27, Col. Ampliación Plan de Ayala, CP 62780, Záratepec, Morelos, México.

*Recibido: Mayo de 2008; Aceptado: Marzo 2009*

### **RESUMEN**

En este trabajo de investigación se estudió la hidrólisis enzimática de los materiales reforzados mezclados y soportados de poliuretano poroso/hidroxiapatita. Las enzimas empleadas en esta investigación fueron la papaína, ureasa y esterasa debido a que estas enzimas han presentado alguna especificidad sobre algún tipo de enlace en el poliuretano. La técnica de caracterización utilizada fue la Espectroscopía por Transformadas de *Fourier* (FTIR) para determinar los grupos funcionales que disminuyen con la hidrólisis así como los productos de la degradación, también se analizan las pérdidas en peso de los diferentes materiales reforzados.

**Palabras claves:** Hidrólisis, enzima, FTIR, materiales compuestos.

### **ABSTRACT**

In this investigation work the enzymatic hydrolysis of the blended and supported composites of porous polyurethane/hydroxyapatite were studied. The enzymes used in this investigation were the papain, urease and esterase because these enzymes have presented some specificity on some type of bond in the polyurethane. The technique of used characterization is the *Fourier* Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) to identify the functional groups that decrease with the hydrolysis as well as the products of the hydrolysis, the losses weight are also analyzed in the different composites.

**Keywords:** Hydrolysis, enzyme, FTIR, composite materials.

### **1. INTRODUCCIÓN**

El poliuretano ha sido utilizado ampliamente en aplicaciones biomédicas y se han implementado diferentes técnicas para evaluar la biocompatibilidad entre las que se puede mencionar técnicas *in vivo* utilizando conejos o *in vitro* utilizando enzima de poliuretano esterasa [1,2]. Las enzimas, en los sistemas biológicos constituyen las bases de las complejas y variadas reacciones que caracterizan los fenómenos vitales y algunas de ellas catalizan la hidrólisis de los materiales, la cual se produce cuando el polímero tiene principalmente enlaces inestables y algún grado de hidrofilia [3]. Por otro lado, uno de los enfoques utilizados para el desarrollo de materiales a ser potencialmente utilizados como sustitutos de

hueso, es por medio de materiales compuestos tipo esponja con una estructura celular interconectada. Por ejemplo, se han utilizado esponjas de poliuretano biodegradables con diferentes hidrofilias en defectos unicorticos y tricorticos en la cresta ilíaca de ovejas que promueven la formación de hueso nuevo con mayor densidad que el original [4]. Por otro lado, el uso de materiales poliméricos compuestos con hidroxiapatita (HA) mejoran la biocompatibilidad del polímeros ya que estos materiales se unen a los tejidos del hueso cuando estos son implantados. En este contexto se han utilizado una gran variedad de polímeros en la elaboración de biomateriales compuestos con hidroxiapatita, como el polietileno.

Además, se ha encontrado que el poliuretano, aún cuando tiene muy buena compatibilidad ya que se utiliza en catéteres, válvulas de corazón e incluso el corazón completo, presenta hidrólisis *in vivo* en algunas aplicaciones debido a que las enzimas, de naturaleza proteínica, son catalizadores que regulan la velocidad a la cual se realizan los procesos fisiológicos, producidos por los organismos vivos [1,5]. Después de la obtención de materiales biocompatibles, es necesario efectuar pruebas de estabilidad *in vitro* o *in vivo* para diseñar sus aplicaciones futuras. El *Minitab* es una herramienta informática enfocada al análisis de datos complejos y a la identificación y resolución de problemas relativos a procesos, por ello el empleo del *Minitab* es útil en el análisis e interpretación de las pérdidas en peso en los materiales compuestos mezclados y soportados, para así obtener las ecuaciones de los modelos matemáticos, mejorando el rendimiento de la síntesis de los diferentes materiales reforzados [6]. Debido a esto, el presente trabajo describe la comparación de la hidrólisis enzimática de los materiales compuestos (mezclados y soportados) con el propósito de analizar las diferencias en los métodos de síntesis de ambos materiales.

## **2. PARTE EXPERIMENTAL**

**2.1. Materiales.** Policaprolactona diol (PM 114,1 g/mol, pureza 90%, *Aldrich*), policaprolactona triol (PM 1.250 g/mol, pureza 90%, *Aldrich*), 1,4-dioxano (PM 88,1 g/mol, pureza 99,7%, *Caledon*), DBTLD (PM 631,6 g/mol, pureza 95%, *Aldrich*), HDI (PM 168,2 g/mol, pureza 99%, *Fluka*), ácido fosfórico (PM 98 g/mol, pureza 85%, *Caledon*), hidróxido de calcio (PM 74,1 g/mol, pureza 95%, *Caledon*), hidróxido de amonio (PM 35,1 g/mol, pureza 90%, *Aldrich*), poliácido acrílico ( $M = 450.000$  g/mol, pureza 90%, *Aldrich*), papaína ( $M = 23.400$  g/mol, pureza 80%, *Aldrich*), ureasa ( $M = 162.000$  g/mol, pureza 80%, *Fluka*), esterasa ( $M = 480.000$  g/mol, pureza 85%, *Aldrich*).

## **2.2. Métodos experimentales.**

**2.2.1. Síntesis de los materiales compuestos mezclados y soportados.** En 1,4-dioxano se disolvieron 30 g de policaprolactona diol ( $M = 1.250$  g/mol) y 2,7 g de policaprolactona triol ( $M = 900$  g/mol). Una vez disueltos estos reactivos se agregó 3,6 mL de 1,6-hexametilen diisocianato, se adicionó 1,5% de dilaurato de dibutilestaño. Para obtener la separación de fases se empleó 0,19 mL de agua. La solución homogénea fue liofilizada a -15°C durante 96 horas a una presión de 0,3 milibar; el polímero fue curado a una temperatura de 60°C y atmósfera de nitrógeno durante 12 horas [7]. La finalidad del poliácido acrílico es formar los enlaces iónicos entre el grupo carboxilo del poliácido acrílico y el calcio presente en la hidroxiapatita, debido al efecto de la difusión en la superficie de la hidroxiapatita, producto de la interacción molecular realizada entre las cadenas del polímero y los cristales en formación de la hidroxiapatita [8, 9].

Tabla 1. Diseño de experimentos para los materiales reforzados mezclados y soportados.

<b>Material reforzado</b>	<b>hidroxiapatita % en peso</b>	<b>poliácido acrílico g</b>
1	15	0,3
2	15	0,9
3	15	1,8
4	30	0,3
5	30	0,9
6	30	1,8
7	45	0,3
8	45	0,9
9	45	1,8

El objetivo principal de la síntesis fue que la superficie del poliuretano soporte las partículas de hidroxiapatita y con la formación de la hidroxiapatita biológica mediante la biominerización a partir del FFS se tenga un exceso de hidroxiapatita en la superficie y por lo tanto el material reforzado incrementa la bioactividad. Los materiales reforzados soportados sintetizados con los diferentes porcentajes de hidroxiapatita, dieron como resultado que incrementaran sus propiedades mecánicas, atribuido a la estructura cristalina de la hidroxiapatita, aunque las propiedades no incrementan en la misma proporción que los

materiales reforzados mezclados, debido al método de la síntesis de los materiales reforzados [10]. En la Tabla 1 se muestra el diseño de experimentos para la síntesis de los materiales reforzados mezclados y soportados.

**2.2.2. Pruebas de hidrólisis enzimática de los materiales compuestos.** Una vez preparadas las soluciones buffer se adicionó cada enzima en concentraciones de 0,1% de la enzima especificada. Los materiales reforzados de 0,1 g se colocaron en viales previamente esterilizados, agregando posteriormente 15 mL de la solución tampón con la enzima. Posteriormente se incubaron los viales a temperaturas que se muestran en la Tabla 2 (temperaturas de reacción), siendo el tiempo de incubación de 15 días. Posteriormente las muestras fueron lavadas y secadas para después realizar las pruebas de caracterización para determinar la hidrólisis sufrida [11].

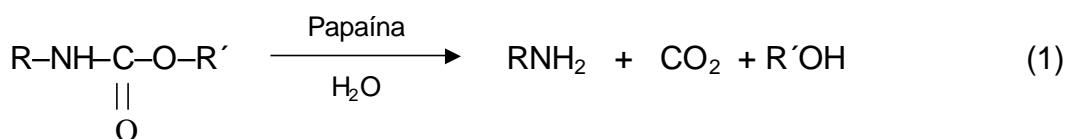
Tabla 2. Características de las enzimas.

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

Para los análisis de FTIR de los diferentes materiales compuestos se empleó un Espectrofotómetro infrarrojo de transformadas de *Fourier*, marca *Pelkin Elmer* modelo *Spectrum One*, mediante la técnica de absorción utilizando pastillas de KBr (200 mg de KBr y 2 mg de muestra) y 16 barridos. Las pérdidas en peso se determinaron mediante el cálculo del área del enlace antes y después de la hidrólisis y así cuantificar el efecto de la enzima específica, esto mediante el software del infrarrojo (IR Mentor Pro).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**3.1. Hidrólisis enzimática de los materiales compuestos por la 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 y grupos amida del poliuretano. El mecanismo de acción propuesto de la enzima es mediante la reacción de hidrólisis expresada en el esquema de reacción 1 [11]:



Como se aprecia en el esquema de reacción 1, la papaína ataca al poliuretano mediante escisión de la cadena polimérica, generando en la hidrólisis aminas primarias y alcoholes y liberando dióxido de carbono. En las Figuras 1 y 2, se presenta los espectros de infrarrojo del material compuesto mezclado y soportado sometidos a la hidrólisis con y sin la enzima papaína. Se puede apreciar rápidamente que la señal correspondiente a los grupos hidroxilo que normalmente se encuentra en el intervalo de  $3.350\text{ cm}^{-1}$ , aumenta de intensidad en el espectro cuando se compara la hidrólisis de la muestra con y sin la enzima, dando evidencia de que la reacción propuesta en 1, se está llevando a cabo [7]. El pico es muy amplio, lo cual es indicativo de que existe puente de hidrógeno en los OH's. La existencia del grupo hidroxilo, producto de la hidrólisis del PU por la enzima papaína, se corrobora con el pico que aparece a aproximadamente  $1.050\text{ cm}^{-1}$  ya que la vibración del estiramiento asimétrico del enlace C-O, acoplado al estiramiento del enlace CC, aparece para un alcohol primario a  $1.050\text{ cm}^{-1}$ .

Por otro lado, la señal del estiramiento del enlace O-H, presenta un hombro que puede adjudicarse a la señal de la vibración del estiramiento asimétrico del enlace N-H de la amina, como producto de la hidrólisis, ya que el estiramiento simétrico de los enlaces HNR-H aparece a aproximadamente  $3.290\text{ cm}^{-1}$  y el estiramiento asimétrico aparece aproximadamente a  $3.300\text{ cm}^{-1}$ . Esta señal no aparece en el material compuesto hidrolizado sin enzima ya que solo presentaría la señal del estiramiento simétrico del enlace N-H de la amida en el poliuretano. Una comprobación de la aparición de las señales de la amina como producto de la hidrólisis del poliuretano por la papaína, es la aparición de una señal debido al tijereteo, solo para aminas primarias, que aparece aproximadamente en  $1615\text{ cm}^{-1}$  [12, 13].

En las Figuras 1 y 2, se presentan los espectros de infrarrojo del material compuesto obtenido mediante mezclado de hidroxiapatita y también el soportado con 30% de hidroxiapatita, sometidos a la acción de la papaína durante 15 días, en donde se aprecian que las bandas de los productos de la hidrólisis, aminas primarias y alcoholes, son mas evidentes en los materiales compuestos mezclados que en los soportados. Esto nos proporciona evidencia cualitativa de que es mejor la estabilidad de los materiales compuestos soportados que los mezclados con hidroxiapatita. Esta evidencia se comprueba con la pérdida de peso que los materiales compuestos soportados y mezclados presentan con el tiempo.

En la Figura 3 se observa que después de 15 días el mayor efecto de la enzima es en el material reforzado mezclado con una pérdida en peso del 4,2%, mientras que el material reforzado soportado presenta una pérdida en peso de 2,4% a los 15 días, siendo favorables

estos porcentajes debido a que en las aplicaciones biomédicas las prótesis deben ser resistentes al ataque enzimático que sufren en el cuerpo humano.

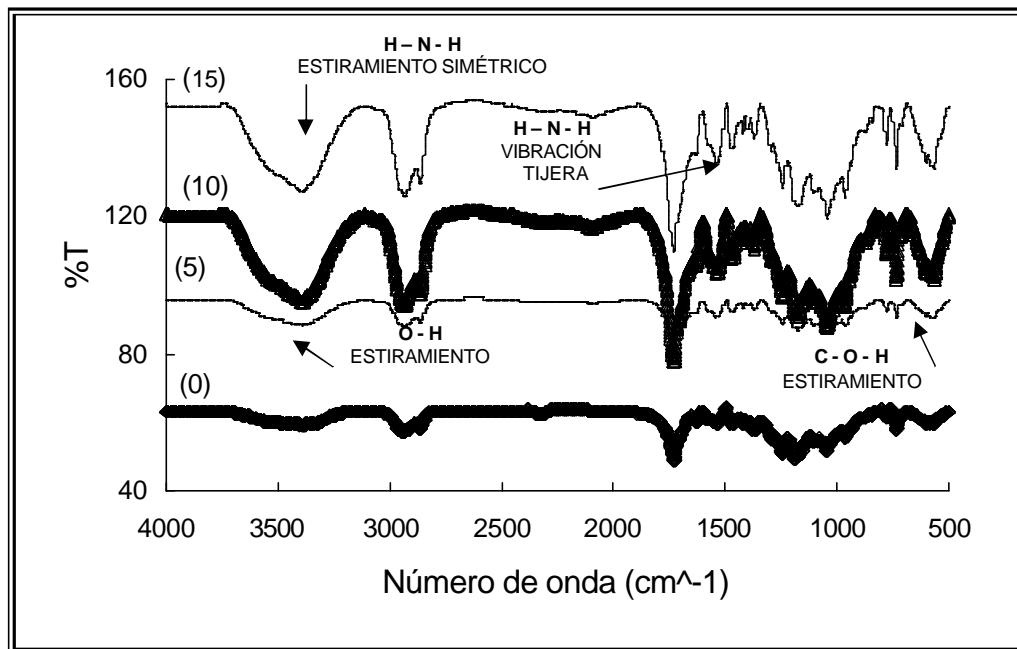


Figura 1. Espectros de infrarrojo de los materiales compuestos mezclados con 30% de HA hidrolizados con la enzima papaína durante 0, 5, 10 y 15 días.

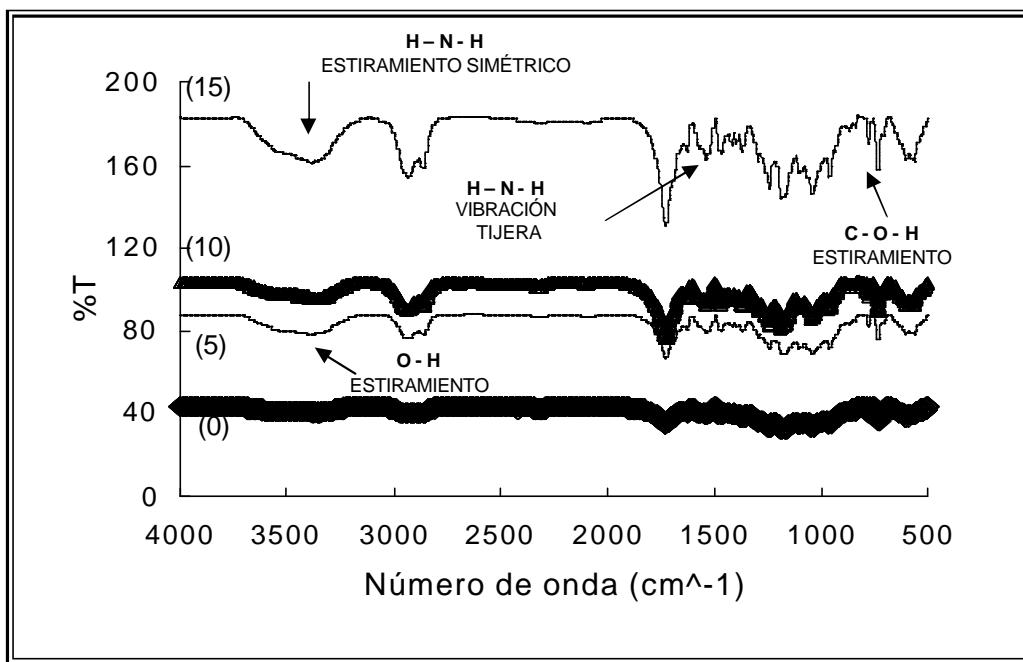


Figura 2. Espectros de infrarrojo de los materiales reforzados soportados con 30% de hidroxiapatita hidrolizados con la enzima papaína durante 0, 5, 10 y 15 días.

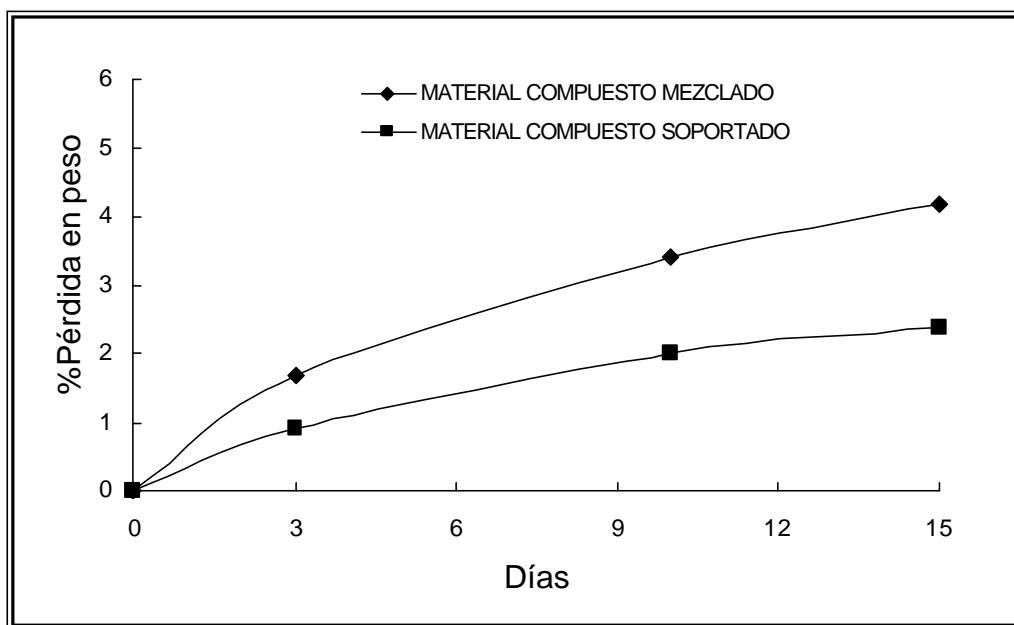


Figura 3. Comparación de los porcentajes de pérdida de peso de los materiales reforzados mezclados y soportados con 30% de hidroxiapatita hidrolizados con la enzima papaína.

**3.1.1. Análisis mediante Minitab después de la hidrólisis enzimática mediante la enzima papaína.** La hidrólisis enzimática de los materiales reforzados con 45% de hidroxiapatita no se llevó a cabo debido a que presentan propiedades mecánicas bajas así como diámetros de poros menores a los requeridos en aplicaciones biomédicas. En las Tablas 3 y 4 se observan los porcentajes de pérdida en peso de los materiales reforzados mezclados y soportados con 15 y 30% de hidroxiapatita, los cuales fueron analizados mediante *Minitab* y se encontró el modelo matemático, el cual indica la ecuación de regresión para determinar la relación que existe entre el tiempo de inmersión y los porcentajes de 15 y 30% de hidroxiapatita de los materiales reforzados (mezclados y soportados) empleados en la hidrólisis.

Tabla 3. Porcentajes de pérdida en peso de los materiales reforzados mezclados con 15 y 30% de hidroxiapatita a diferentes períodos de tiempo utilizando la enzima papaína.

Muestras	Tiempo Días	15% hidroxiapatita % pérdida en peso	30% hidroxiapatita % pérdida en peso
1	0	0,00	0,00
2	5	2,35	1,95
3	10	5,27	3,89
4	15	6,35	4,52

Tabla 4. Porcentajes de pérdida en peso de los materiales reforzados soportados con 15 y 30% de hidroxiapatita a diferentes períodos de tiempo utilizando la enzima papaína.

Muestras	Tiempo Días	15% hidroxiapatita % pérdida en peso	30% hidroxiapatita % pérdida en peso
1	0	0,00	0,00
2	5	2,15	1,89
3	10	4,25	2,85
4	15	5,00	3,17

En las ecuaciones (1) y (2) se muestran los modelos matemáticos con un porcentaje de efectividad de la formación de la HA carbonatada del 94,6 y 92,8% durante el periodo (1 a 15 días) de la hidrólisis de los materiales reforzados mezclados y soportados, respectivamente, en donde se mantiene constante la PCL diol y triol, dioxano, HDI, DBTLD, agua, hidroxiapatita y PAA a 20 g, 1,54 g, 27 mL, 2,13 mL, 0,5%, 0,19 mL, 30% y 0,6 g, respectivamente.

$$\% \text{ pérdida en peso de los materiales mezclados} = 1,93 - 0,352 \text{ tiempo} - 0,06\% \text{ HA} \quad (1)$$

$$\% \text{ pérdida en peso de los materiales soportados} = 2,2 - 0,261 \text{ tiempo} - 0,075\% \text{ HA} \quad (2)$$

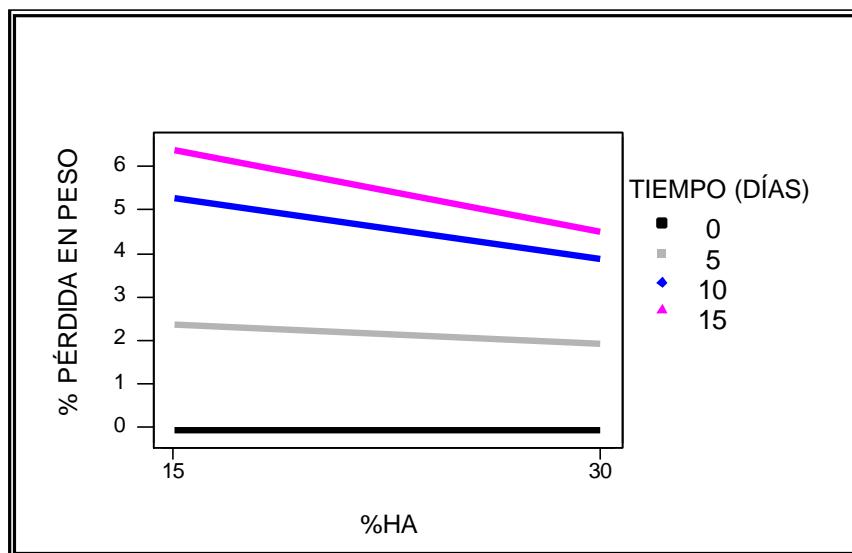


Figura 4. Representación de los porcentajes de pérdida en peso con respecto a diferentes períodos de tiempo de los materiales reforzados mezclados con 15 y 30% de hidroxiapatita después de la hidrólisis.

Analizando los resultados de las Tablas 3 y 4 mediante el *Minitab* se obtuvieron las Figuras 4 y 5, en donde se muestran los efecto de la hidrólisis enzimática durante 0, 1, 5 y 15 días en los materiales reforzados (mezclados y soportados) con 15 y 30% de hidroxiapatita, el

cual se determinó mediante el programa *Minitab*, observándose que conforme transcurre el tiempo, el porcentaje de pérdida en peso se incrementa en ambos materiales reforzados, esto debido a que la enzima principalmente ataca a los enlaces del grupo uretano. Además, se observa que la hidrólisis afecta principalmente a los materiales reforzados con 15% ya que existe mayor área de acción para la enzima.

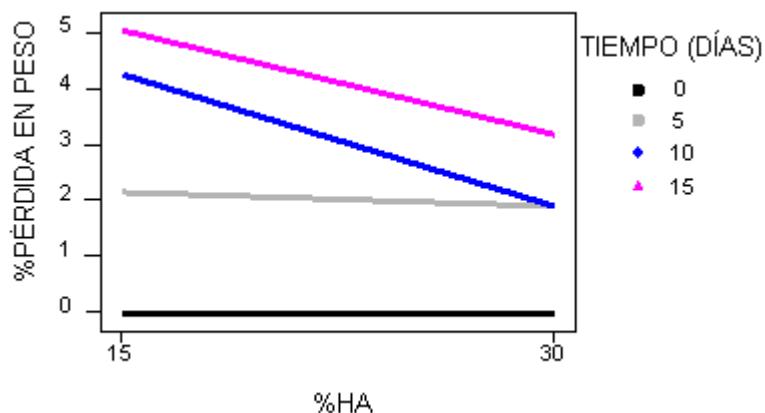
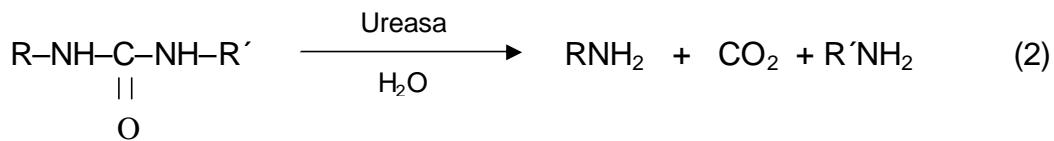


Figura 5. Representación de los porcentajes de pérdida en peso con respecto a diferentes períodos de tiempo de los materiales reforzados soportados con 15 y 30% de hidroxiapatita después de la hidrólisis.

**3.2. Hidrólisis enzimática de los materiales compuestos por la enzima ureasa.** La enzima ureasa se encuentra en los leucocitos, y se caracteriza por que afecta los enlaces de la urea y grupos amida del uretano, en la reacción 2 de hidrólisis se observa el mecanismo de acción propuesto de la enzima.



En cuanto a las muestras sometidas a la acción de la ureasa, en las Figuras 6 y 7 se aprecian los espectros de infrarrojo correspondientes al material reforzado mezclado y soportado con 30% de HA, en donde se presentan las bandas características de los productos de la hidrólisis, alrededor de 1.700 a 1.715 cm<sup>-1</sup> se presenta la banda del carbonilo asociada con la urea soluble y la de 1640 cm<sup>-1</sup> asociada con la urea, formando enlace de hidrógeno. Además de la banda a 1.598 cm<sup>-1</sup> que disminuye conforme se incrementa el tiempo de hidrólisis es atribuida a la flexión NH de la amida II relacionada con la formación de la urea, de 1.397 a 1.237 cm<sup>-1</sup> del estiramiento O-C-O del COOH, de 1.177 a 1.084 cm<sup>-1</sup> debido al estiramiento del enlace C-O-C del uretano que se atribuyen a la hidrólisis [14]).

Los resultados obtenidos del porcentaje de pérdida en peso de la hidrólisis del material

reforzado mezclado y soportado con 30% de hidroxiapatita se muestran en la figura 8 en donde se puede observar que la tendencia fue de aumentar la hidrólisis conforme al tiempo de acción de la enzima. También se observa que los porcentajes de pérdida en peso para el material reforzado mezclado fue de 3% y para el material reforzado soportado de 2,1% a los 15 días respectivamente, estos porcentajes de hidrólisis son adecuados, debido a que los materiales reforzados sufren el ataque enzimático en el cuerpo humano y deben conservar sus propiedades mecánicas para las diversas aplicaciones biomédicas que realizan.

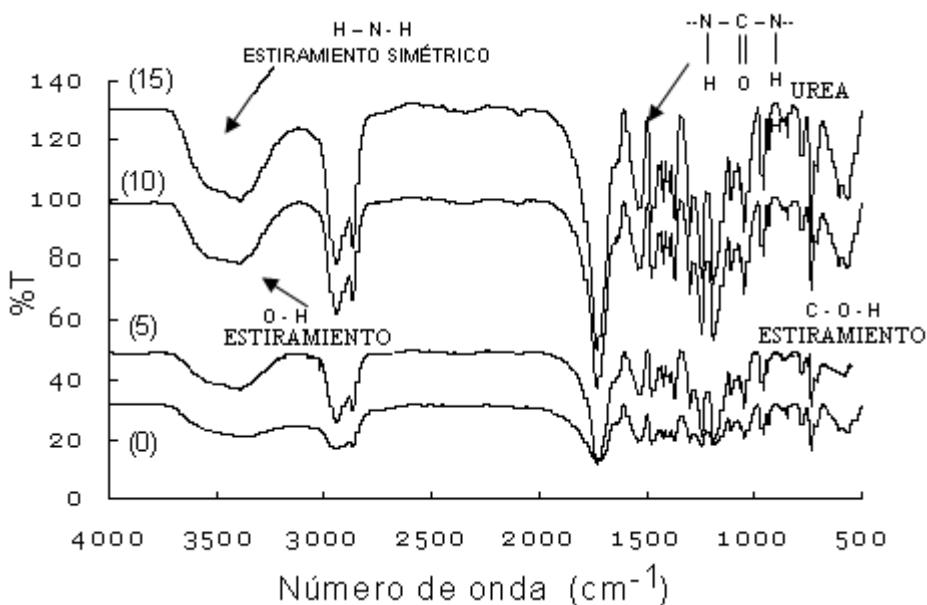


Figura 6. Espectros de infrarrojo de los materiales reforzados mezclados con 30% de hidroxiapatita hidrolizados con la enzima ureasa durante 0, 5, 10 y 15 días.

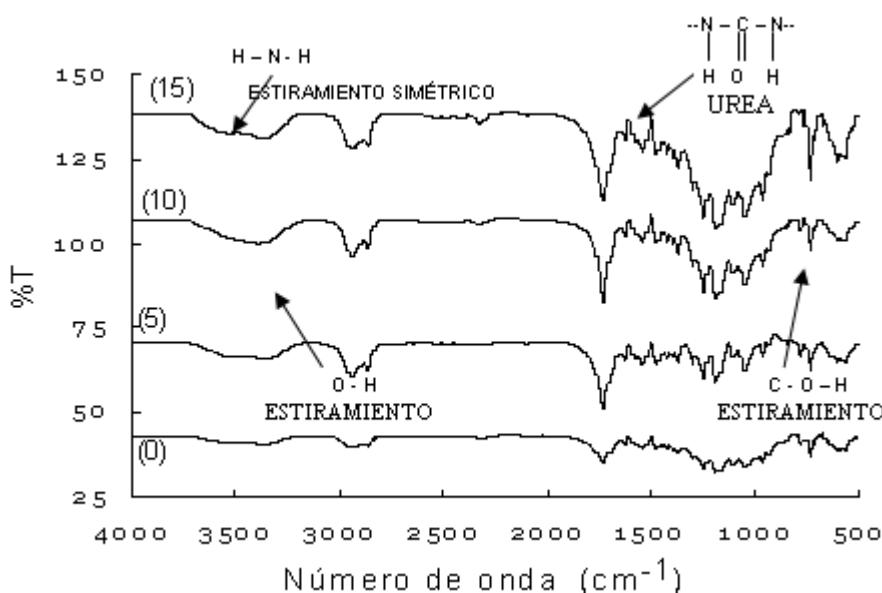


Figura 7. Espectros de infrarrojo de los materiales reforzados soportados con 30% de hidroxiapatita hidrolizados con la enzima ureasa a 0, 5, 10 y 15 días.

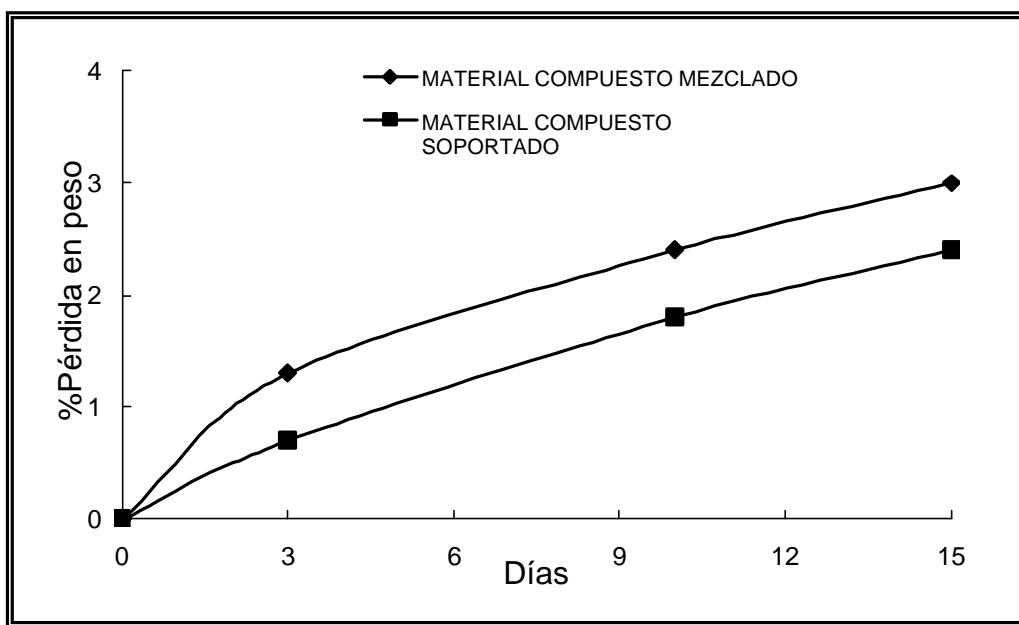


Figura 8. Comparación de los porcentajes de pérdida de peso de los materiales reforzados soportados y mezclados con 30% de HA hidrolizados con la enzima ureasa.

**3.2.1. Análisis mediante Minitab después de la hidrólisis enzimática mediante la enzima ureasa.** La hidrólisis enzimática de los materiales reforzados con 45% de hidroxiapatita no se llevó a cabo debido a que presentan propiedades mecánicas bajas así como diámetros de poros menores a los requeridos en aplicaciones biomédicas. En las Tablas 5 y 6 se observan los porcentajes de pérdida en peso de los materiales reforzados mezclados y soportados con 15 y 30% de hidroxiapatita, los cuales fueron analizados mediante *Minitab* y se encontró el modelo matemático, el cual indica la ecuación de regresión para determinar la relación que existe entre el tiempo de inmersión y los porcentajes de hidroxiapatita de los materiales reforzados (mezclados y soportados) empleados en la hidrólisis.

Tabla 5. Porcentajes de pérdida en peso de los materiales reforzados mezclados con 15 y 30% de hidroxiapatita a diferentes períodos de tiempo utilizando la enzima ureasa.

Muestras	Tiempo Días	15% hidroxiapatita % pérdida en peso	30% hidroxiapatita % pérdida en peso
1	0	0,00	0,00
2	5	2,18	1,71
3	10	4,29	2,63
4	15	5,30	3,29

Tabla 6. Porcentajes de pérdida en peso de los materiales reforzados soportados con 15 y 30% de hidroxiapatita a diferentes períodos de tiempo utilizando la enzima ureasa.

Muestras	Tiempo Días	15% hidroxiapatita % Pérdida en peso	30% hidroxiapatita % Pérdida en peso
1	0	0,00	0,00
2	5	1,93	1,54
3	10	2,48	2,25
4	15	3,15	2,96

En las ecuaciones (3) y (4) se muestran los modelos matemático con un porcentaje de efectividad de la formación de la hidroxiapatita carbonatada del 90,6 y 88,7% durante diversos períodos (1 a 15 días) de la hidrólisis de los materiales reforzados mezclados y soportados.

$$\% \text{pérdida en peso de los compositos mezclados} = 21 - 0,27t - 0,071\% \text{HA} \quad (3)$$

$$\% \text{pérdida en peso de los compositos soportados} = 0,69 - 0,2t - 0,016\% \text{HA} \quad (4)$$

Analizando los datos de las Tablas 5 y 6 mediante el *Minitab* se obtuvieron las Figuras 9 y 10, en donde se muestran los efecto de la hidrólisis enzimática durante 1, 5 y 15 días en los materiales reforzados (mezclados y soportados) con 15 y 30% de hidroxiapatita, el cual se determinó mediante el programa *Minitab*, observándose que conforme transcurre el tiempo, el porcentaje de pérdida en peso se incrementa en ambos materiales reforzados, esto debido a que la enzima tiene mayor acción en el ataque a los enlaces del grupo uretano, además se observa que la hidrólisis afecta principalmente a los materiales reforzados con 15% ya que existe mayor área de acción para la enzima.

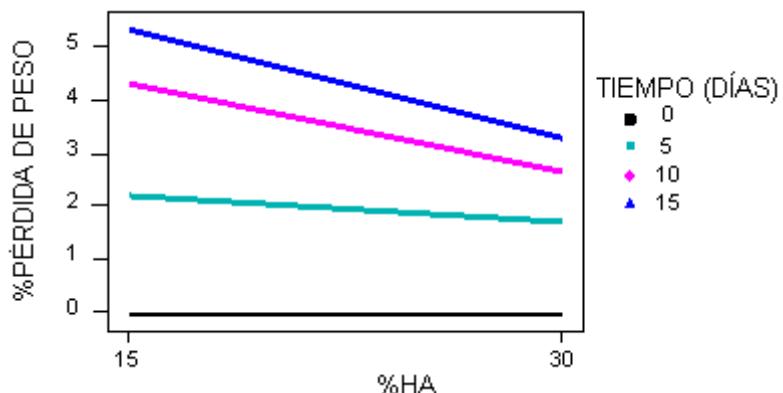


Figura 9. Representación de los porcentajes de pérdida en peso con respecto a diferentes períodos de tiempo de los materiales reforzados mezclados con 5% y 30% de HA después de la hidrólisis.

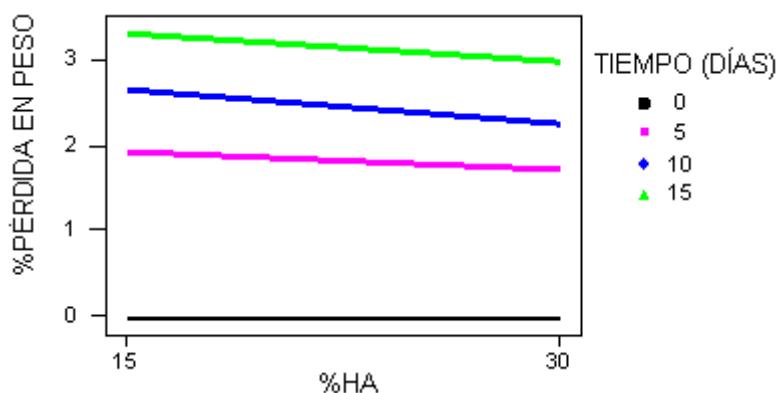


Figura 10. Representación de los porcentajes de pérdida en peso con respecto a diferentes períodos de tiempo de los materiales reforzados soportados con 15% y 30% de HA después de la hidrólisis.

**3.3. Hidrólisis enzimática de los materiales reforzados por la enzima esterasa.** La enzima esterasa se caracteriza por que afecta los enlaces ésteres del poliuretano y el mecanismo de acción de la enzima es mediante la hidrólisis del grupo éster del poliuretano, tal como se describe en el esquema de reacción 3:

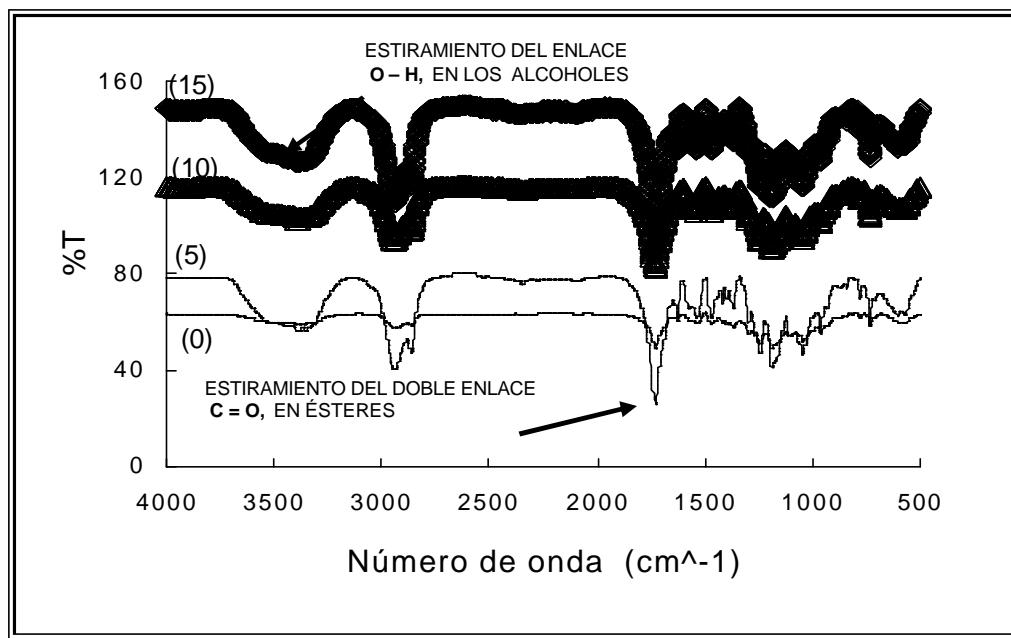
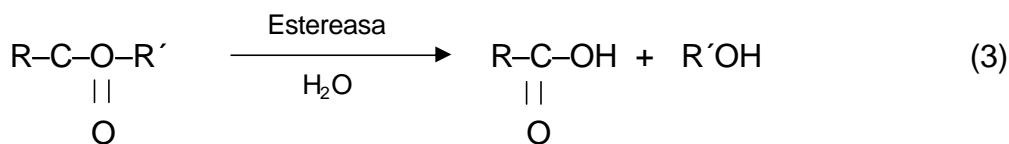


Figura 11. Espectros de infrarrojo de los materiales reforzados mezclados con 30% de hidroxiapatita hidrolizados con la enzima esterasa a diferentes períodos de tiempo.

En las Figuras 11 y 12 se aprecia el espectro de infrarrojo correspondiente a los

materiales compuestos mezclados y soportados con 30% de hidroxiapatita sometido a la enzima esterasa, en donde se observa la presencia de las bandas atribuidas a la degradación a  $1.410\text{ cm}^{-1}$  debido al estiramiento del COO, de  $1.350$  a  $1.300\text{ cm}^{-1}$  del al estiramiento (OCO) del COOH, de  $1.275$  a  $1.250\text{ cm}^{-1}$  del enlace C-O del  $\text{CH}_2\text{-OH}$ , a  $1.174\text{ cm}^{-1}$  del (OCO) del CO-O-CH<sub>2</sub> y finalmente a  $637\text{ cm}^{-1}$  por el estiramiento C-O [15, 16]. En la Figura 13, se presentan los porcentajes de pérdida en peso del material reforzado mezclado y soportado con 30% de hidroxiapatita, en donde se observa que los materiales reforzados se empiezan estabilizar a los 13 días, los porcentajes de pérdida en peso de los materiales reforzados mezclado y soportado fueron de 2 y 1,7%, respectivamente.

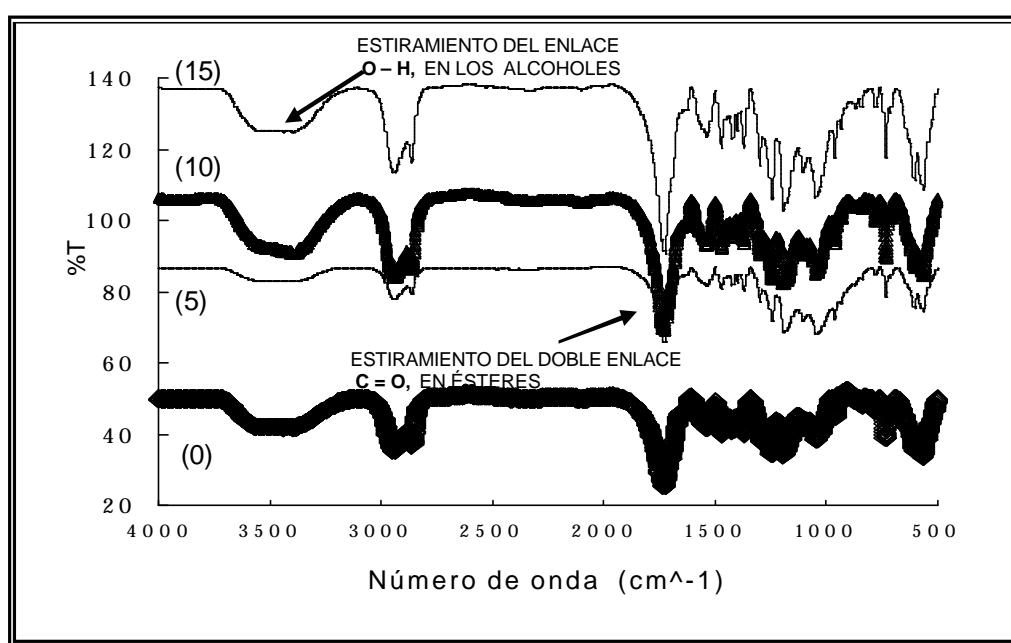


Figura 12. Espectros de infrarrojo de los materiales reforzados soportados con 30% de hidroxiapatita hidrolizados con la enzima esterasa a diferentes periodos de tiempo.

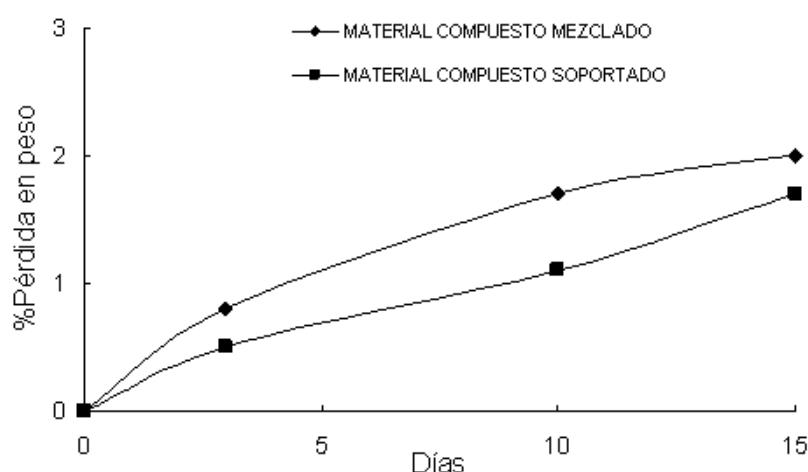


Figura 13. Comparación de los porcentajes de pérdida de peso de los materiales reforzados soportados y mezclados con 30% de hidroxiapatita hidrolizados con la enzima esterasa.

**3.3.1. Análisis mediante Minitab después de la hidrólisis enzimática mediante la enzima esterasa.** La hidrólisis enzimática de los materiales reforzados con 45% de hidroxiapatita no se llevó realizaron debido a que presentan propiedades mecánicas bajas así como diámetros de poros menores a los requeridos en aplicaciones biomédicas. En las Tablas 7 y 8 se observan los porcentajes de pérdida en peso de los materiales reforzados mezclados y soportados con 15 y 30% de hidroxiapatita, los cuales fueron analizados mediante *Minitab* y se encontró el modelo matemático, el cual indica la ecuación de regresión para determinar la relación que existe entre el tiempo de inmersión y los porcentajes de hidroxiapatita de los materiales reforzados (mezclados y soportados) empleados en la hidrólisis.

Tabla 7. Porcentajes de pérdida en peso de los materiales reforzados mezclados con 15 y 30% de hidroxiapatita a diferentes períodos de tiempo utilizando la enzima esterasa.

Muestras	Tiempo Días	15% hidroxiapatita % pérdida en peso	30% hidroxiapatita % pérdida en peso
1	0	0,00	0,00
2	5	1,98	1,53
3	10	3,91	2,27
4	15	4,95	3,16

Tabla 8. Porcentajes de pérdida en peso de los materiales reforzados soportados con 15 y 30% de hidroxiapatita a diferentes períodos de tiempo utilizando la enzima esterasa.

Muestras	Tiempo Días	15% hidroxiapatita % pérdida en peso	30% hidroxiapatita % pérdida en peso
1	0	0,00	0,00
2	5	1,69	1,34
3	10	2,54	1,97
4	15	2,89	2,35

En las ecuaciones (5) y (6) se muestran los modelos matemático con un porcentaje de efectividad de la formación de la hidroxiapatita carbonatada del 87,13 y 85,23% durante diversos períodos (1 a 15 días) de la hidrólisis de los materiales reforzados mezclados y soportados:

$$\% \text{ pérdida en peso de los materiales mezclados} = 1,65 - 0,27 \text{ tiempo} - 0,065\% \text{ HA} \quad (5)$$

$$\% \text{ pérdida en peso de los materiales soportados} = 0,85 - 0,17 \text{ tiempo} - 0,024\% \text{ HA} \quad (6)$$

Analizando los datos de las Tablas 7 y 8 mediante el *Minitab* se obtuvieron las Figuras 14 y 15, en donde se muestran los efecto de la hidrólisis enzimática durante 1, 5 y 15 días en los materiales reforzados (mezclados y soportados) con 15 y 30% de hidroxiapatita, el cual se determinó mediante el programa *Minitab*, observándose que conforme transcurre el tiempo, el porcentaje de pérdida en peso se incrementa en ambos materiales reforzados, esto debido a que la enzima tiene mayor acción en el ataque a los enlaces del grupo uretano, además se observa que la hidrólisis afecta principalmente a los materiales reforzados con 15% ya que existe mayor área de acción para la enzima.

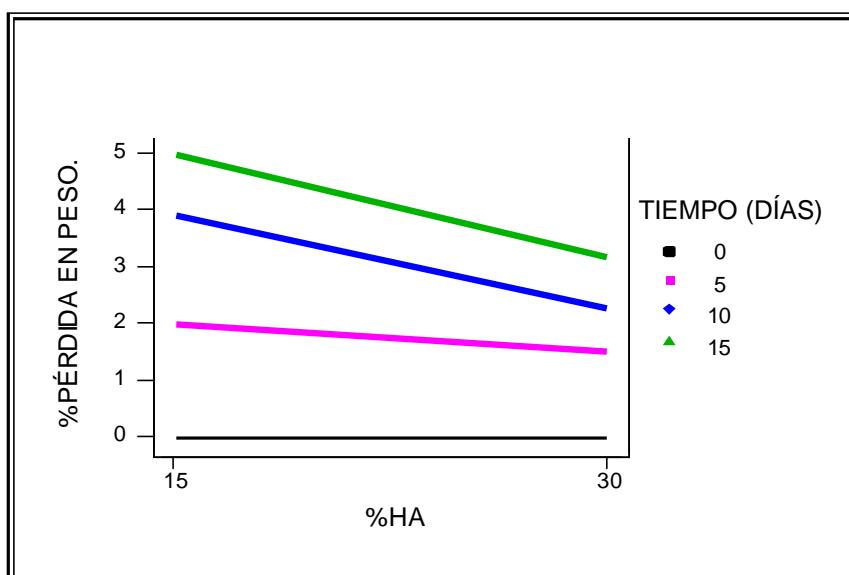


Figura 14. Representación de los porcentajes de pérdida en peso con respecto a diferentes períodos de tiempo de los materiales reforzados mezclados con 15 y 30% de hidroxiapatita después de la hidrólisis.

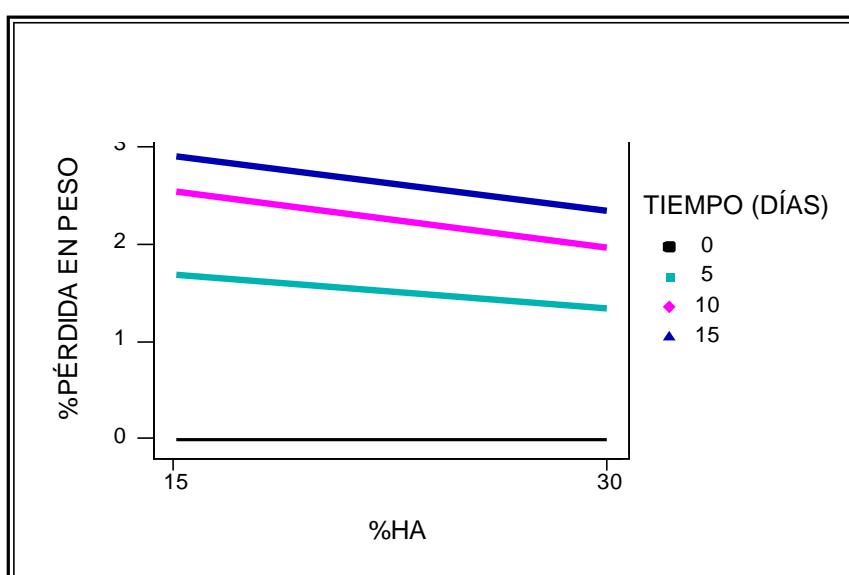


Figura 15. Representación de los porcentajes de pérdida en peso con respectos a diferentes períodos de tiempo de los materiales reforzados soportados con 15 y 30% de hidroxiapatita después de la hidrólisis.

#### **4. CONCLUSIONES**

Los espectros de infrarrojo del material reforzado mezclado y del soportado 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 materiales reforzados (mezclado y soportado) son más susceptibles a ser hidrolizados mediante la enzima papaína (4,2 y 2,4% respectivamente), por lo tanto, en este estudio se determinó que los materiales reforzados mezclado y soportado son vulnerables a las reacciones de hidrólisis, las cuales se llevan en dos pasos: primero una adsorción hidrófoba en la superficie seguida de la hidrólisis del enlace éster del poliuretano. De acuerdo al mecanismo de reacción propuesto y en base a los resultados de las enzimas papaína, ureasa y esterasa se determinó que el mecanismo de la cinética de la hidrólisis se lleva a cabo mediante primer orden de reacción debido a una asociación rápida de la enzima (E) con el sustrato (S) para formar el complejo enzima-sustrato (ES) el cual posteriormente se convierte en productos y enzima. Los porcentajes de pérdida en peso son adecuados debido a que en las aplicaciones biomédicas las prótesis deben ser resistentes a la acción enzimática que ocurre en el cuerpo humano. Mediante el empleo del software *Minitab* se determinaron las diversas ecuaciones de los modelos matemáticos y efectividades óptimas al ser superiores al mínimo establecido por el software (70%) en las enzimas lo que indicó que el procedimiento fue realizado con cada enzima fue de manera óptima.

**Agradecimientos.** A la Dirección General de Educación Superior Tecnológica (DGEST) por la beca otorgada 402003076MP. A la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Cd. Madero, México, al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) de *Saltillo, México* y a la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de *Zacatepec, México*.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

1. Asha S, Mathew K, Sreenivasan PV, Mohanan TV, *Trends Biomater. Artif. Organs*, **19**(2), 115 (2006).
2. Akutsu Y, Nakajima-Kambe T, Nomura N, Nakahara T, *Applied And Environmental Microbiology*, **64**(1), 62–67 (1998).
3. Dillon JG, Hughes MK, *Biomaterials*, **13**(4), 240-8 (1999).
4. Gogolewski S, *European Cells and Materials*, **1**(2), 54-55 (2001).
5. Martínez PCA, Desarrollo de un Material Compuesto Poliuretano/Hidroxiapatita por un Método Biomimético, Tesis de Doctorado, CIMAV-CIQA (2001)
6. Rangel-Vázquez NA, De Alva SHE, Romero GJ, García-Hernández E, *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **8**(2), 99 (2007)
7. Rangel VNA “*Poliuretano Poroso/Hidroxiapatita Para Aplicaciones Biomédicas: Síntesis y Caracterización*”. Tesis Doctoral, Ciudad Madero, Tamaulipas, México. División de Estudios de

- Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Ciudad Madero (2007).
- 8. Martínez PCA, Martínez VA, Romero GJ, *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, **21**(4), 137 (2000)
  - 9. Majekodunmi AO, Deb S, Nicholson JW, *J. Materials Science: Materials in Medicine*, **14**, 9 (2003)
  - 10. Kato K, Eika Y, Ikada Y “In Situ Hydroxyapatite Crystallization for the Formation of Hydroxyapatite/Polymer Composites”. Tesis de Doctorado, Universidad de Kyoto (2005)
  - 11. Bertoni E, Bigi A, Falini G, Panzavolta S y Roveri N, *Journal Materials Chemistry*; **9**(1), 779 (1999)
  - 12. Phua SK, Castillo E, Anderson JM, Hiltner A, *Journal Biomedical Materials Research*, **21**, 231 (1987)
  - 13. Dawkins G, Hewitt H, Wint Y, Obiefuna PC, Wint B, *West Indian Med Journal*, **52**, 290 (2003)
  - 14. Balasubramanian R, Balasundaram J, Subramanian K, Narayanan M, *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1645 (2002)
  - 15. Estiu G, Merz KM, *J. Amer. Chem. Soc.*, **126**, 6932 (2004)
  - 16. Elnicki M, *E. Medicine*, **3**, 1 (2005)