



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Ingeniería Química

División de Estudios de Posgrado

“Optimización matemática y síntesis de bionanomateriales base colágeno con potencial aplicaciones en el área biomédica”

TESIS PRESENTADA POR:

Julia Hernández Vargas

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

Asesor:

Dr. Javier Lara Romero

Co-asesora:

Dra. J. Betzabe González Campos

Sinodales:

Dr. José Ma. Ponce Ortega

Dr. Rafael Huirache Acuña

Dr. Rafael Maya Yescas

Morelia, Michoacán. Enero del 2017

RESUMEN

“Preparación y caracterización de nanofibras poliméricas base colágeno con potencial aplicaciones en el área biomédica”

Julia Hernández Vargas

Doctora en Ciencias en Ingeniería Química

Dirigida por: Dr. Javier Lara Romero y Dra. J. Betzabe González Campos

El presente trabajo está dividido en una parte teórica y una parte experimental y tiene como finalidad diferentes objetivos los cuales están divididos en 3 capítulos, la parte teórica se analiza en el **capítulo II** donde se presenta el estudio de la optimización del proceso de síntesis de nanomateriales que incluyen el electrospinning para la obtención de las nanofibras poliméricas y los métodos de descarga de arco, ablación láser y deposición química en fase vapor (CVD) para la preparación de los nanotubos de carbono, la parte experimental se muestra en el **capítulo III** donde presentaremos la síntesis y caracterización de dichos materiales ya como tal así como su caracterización física y química; y finalmente en el **capítulo IV** se evaluarán las biocompatibilidad a las 24 horas mediante la tinción de células con azul de Toluidina y cristal violeta y la citotoxicidad a 72 horas con la técnica MTT de los materiales obtenidos mediante el cultivo de células HT29 de cáncer de colon.

Palabras clave: Bionanomaterial, nanofibra polimérica, optimización matemática, aplicaciones biomédicas.

ABSTRACT

“Preparation and characterization of polymeric nanofibers based collagen type II reinforced by carbon nanotubes for biomedical applications”

Julia Hernández Vargas

Doctor of Science in Chemical Engineering

Adviser: Dr. Javier Lara Romero and Dra. J. Betzabe González Campos

The present work is distributed in a theoretical part and an experimental part and has as aim different objectives which are divided into 3 chapters, the theoretical part is analyzed in **chapter II** where the study of the optimization of the synthesis process of nanomaterials Which include electrospinning for the preparation of polymer nanofibers and methods of arc discharge, laser ablation and chemical vapor deposition (CVD) for the production of carbon nanotubes; the experimental part is shown in **chapter III** where we present The synthesis and characterization of these materials as such as well as their physical and chemical characterization; And finally in **chapter IV** biocompatibility will be evaluated at 24 hours by staining cells with Toluidine blue and violet crystal and cytotoxicity at 72 hours with the MTT technique of the materials obtained by the culture of colon cancer HT29 cells .

Keywords: Bionanomaterial, polymer nanofiber, mathematical optimization, biomedical applications.

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía a cada instante, por darme la fuerza para seguir adelante cuando he estado a punto de desistir y por poner en mi camino a las personas adecuadas en el momento oportuno y en tiempo correcto.

A mis hijas Valeria y Ximena por ser mis compañeras de vida y mi motivación e inspiración para seguir adelante siempre. Y a mi esposo Patricio, por el apoyo incondicional que siempre me ha brindado y la paciencia.

A mis padres por darme la vida y a mis hermanos por ser mis compañeros de vida y por apoyarme e impulsarme en todos los proyectos emprendidos. Mamá eres el mejor ejemplo de amor, paciencia y fortaleza del mundo.

AGRADECIMIENTOS

A mi co-asesora, la Dra. J. Betzabe González Campos por la gran oportunidad de aprender de su experiencia y la confianza y motivación para realizar este proyecto y por sus consejos y tiempo dedicado a la realización del mismo. Gracias por el soporte en todos los aspectos.

A mi asesor, el Dr. Javier Lara por la confianza, tiempo y observaciones brindadas en el desarrollo del trabajo.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en especial al posgrado de Ingeniería química y al Instituto de Químico-Biológicas, por haberme brindado las herramientas y conocimientos necesarios para mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento económico durante el desarrollo del doctorado.

A la Dra. Zaira García por las observaciones y por permitir realizar parte del desarrollo experimental en el CIATEJ.

A mis sinodales, Dr. Rafael Maya Yescas y Dr. Huirache Acuña por todas sus observaciones y comentarios para el mejoramiento de mi trabajo y Dr. José Ma. Ponce Ortega por los conocimientos brindados, la experiencia compartida y todos los consejos.

A la planta docente y administrativa del posgrado de Ingeniería química, por todo su apoyo y conocimientos compartidos que me guiaron en el desarrollo de mi doctorado.

A mis compañeras y amigas, por la ayuda, apoyo y tiempo brindado en el desarrollo del trabajo y proceso de titulación, no las nombro para evitar excluir algun@ pero ustedes saben quiénes son por estar siempre presentes durante todo este tiempo.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	i
Abstract.....	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos.....	iv
Lista de Figuras	ix
Lista de Tablas.	xii
Lista de abreviaturas y símbolos	xiv

CAPITULO I: INTRODUCCION

1.1 Generalidades.....	3
1.1.1 Biopolímeros definición, propiedades y clasificación.	4
1.1.2 El Colágeno	6
1.1.3 El alcohol polivinílico (PVA).....	8
1.1.4 El Sulfato de Condroitina (SC).	9
1.1.5 Ácido Hialurónico (HA)	9
1.1.6 Nanofibras poliméricas base colágeno tipo II	12
1.1.7 Nanofibras poliméricas reforzadas con Nanotubos de Carbono	13
1.1.8 La optimización en los procesos de síntesis de nanomateriales y sus posibles aplicaciones.....	14
1.2 Justificación.....	15
1.3 Hipótesis	16
1.4 Objetivos	16
1.4.1 Objetivo general	16
1.4.2 Objetivos específicos.....	16

CAPITULO II: OPTIMIZACIÓN TEÓRICA DE LA SÍNTESIS DE NANOMATERIALES

2.1 Optimización matemática de la síntesis de nanotubos de carbono	17
2.1.1 Los Nanotubos de carbono	17

2.1.2	Optimización del proceso de síntesis de nanotubos de carbono	19
2.1.3	Propuesta del modelo matemático	21
2.1.4	Caso de estudio	22
2.1.5	Resultados y Discusión.....	25
2.2	Optimización matemática de la síntesis de nanofibras poliméricas	27
2.2.1	Las Nanofibras poliméricas	27
2.2.2	Propiedades de las nanofibras poliméricas como nanomateriales.	28
2.2.2.1	Propiedades biológicas.....	28
2.2.2.2	Propiedades físico – químicas.....	29
2.2.2.3	Propiedades mecánicas	29
2.2.3	Aplicaciones biomédicas de las nanofibras poliméricas.....	30
2.2.4	Síntesis de Nanofibras poliméricas.....	31
2.2.5	El electrohilado	32
2.2.5.1	Variables de Proceso de electrohilado	33
2.2.5.2	Parámetros de la solución.....	33
2.2.5.3	Parámetros del proceso.	35
2.2.5.4	Parámetros ambientales.....	36
2.2.6	Optimización de la síntesis de nanofibras por medio del electrohilado ...	37
2.2.7	Caso de estudio.....	39
2.2.8	Resultados y Discusión.	44
2.2.9	Resultados de optimización.	47
2.3	Conclusiones parciales del capítulo.	50

CAPITULO III: SÍNTESIS DE NANOMATERIALES

3.1	Síntesis de nanotubos de carbono por el método spray pirólisis.....	52
3.1.1	Materiales y Equipos	52
3.1.2	Purificación y funcionalización de NTC en agua.	53
3.2	Caracterización de nanotubos de carbono.	56
3.3	Síntesis de nanomateriales poliméricos.	58
3.3.1	Nanofibras poliméricas.....	58
3.3.1.1	Materiales y Equipos para síntesis de nanofibras.	58

3.3.2	Caracterización de nanofibras poliméricas.....	60
3.3.2.1	Nanofibras Colágeno/PVA	61
3.3.2.2	Nanofibras Colágeno/SC.....	68
3.3.2.3	Nanofibras Colágeno/HA.....	73
3.3.2.4	Nanofibras Colágeno/PVA-SC	78
3.3.2.5	Nanofibras Colágeno/PVA-HA.....	84
3.3.2.6	Nanofibras Colágeno/SC-HA	90
3.2.1.7	Nanofibras Colágeno/PVA-SC-HA.....	96
3.4	Películas delgadas.....	99
3.4.1	Materiales y Equipos para síntesis de películas delgadas.	99
3.4.2	Películas delgadas de Colágeno/PVA-SC-NTC	100
3.4.3	Películas delgadas de Colágeno/PVA-SC-HA-NTC.....	105
3.5	Evaluación del porcentaje de hinchamiento (%H) en los nanomateriales sintetizados	109
3.5.1	Sensibilidad al pH de los nanomateriales	111
3.6	Análisis comparativo de las nanofibras poliméricas obtenidas.	111

CAPITULO IV: BIOCOMPATIBILIDAD Y CITOTOXICIDAD DE LOS NANOMATERIALES EN CÉLULAS HT29

4.1	Células HT29 como modelos de diferenciación <i>in vitro</i> de Cáncer colon rectal.....	113
4.2	Los nanomateriales y cáncer colon rectal.....	115
4.3	Cultivo de células HT29 preliminar	116
4.4	Cultivo de células HT29 en los materiales poliméricos.	119
4.4.1	Materiales y Equipos	119
4.4.2	Preparación de los materiales poliméricos.....	120
4.4.3	Estudio de Adhesión celular (Biocompatibilidad)	124
4.4.4	Ensayo de Adhesión celular con azul de Toluidina	124
4.4.5	Ensayo de Adhesión celular por cristal violeta	127
4.5	Estudio de viabilidad-citotoxicidad	130
4.5.1	Ensayo MTT preliminar de células HT29.....	130

4.5.2	Ensayo MTT con materiales poliméricos	133
-------	---	-----

CAPITULO V: CONCLUSIONES

Conclusiones .		137
----------------	-------	-----

CAPITULO VI: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Referencias bibliográficas	139
----------------------------------	-----

CAPITULO VII: ANEXOS

7.1	Técnicas de Caracterización	145
7.1.1.	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	145
7.1.2	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	145
7.1.3	Espectroscopia Raman	145
7.1.4	Análisis Termogravimétrico	145
7.1.5	Espectroscopía Raman	145
7.1.6	Espectroscopía de Infrarrojo	146
7.1.7	% de Hinchamiento	146
7.1.6.	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	146
7.2	Caracterización biológica.....	146
7.2.1	Análisis de las moléculas de adhesión por RT-PCR.....	146
7.2.2	Técnica para conteo de células por el método de exclusión con azul de Tripano	148
7.3	Publicaciones realizadas	150

1.1 LISTA DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1 Esquema representativo de la clasificación de los Nanomateriales	4
Figura 2 Esquema representativo de la clasificación de los biopolímeros	5
Figura 3 Estructura molecular del colágeno	8
Figura 4 Estructura química del alcohol polivinílico (PVA)	8
Figura 5 Estructura química del sulfato de condroitina (SC).	9
Figura 6 Estructura química del ácido hialurónico (HA).	10
Figura 7 Nanotubos de carbono	18
Figura 8 Interrelaciones de las variables manipuladas para la síntesis de NTC con las propiedades deseadas.	21
Figura 9 Resultados para costo y eficiencia para cada método de síntesis estudiado	267
Figura 11 Aplicaciones biomédicas de las nanofibras.	311
Figura 12 Esquema representativo del proceso de electrohilado para la síntesis de nanofibras	333
Figura 13 Resultados de la interacción de parámetros de la síntesis de nanofibras de colágeno	45
Figura 14 Resultados de la interacción de parámetros de la síntesis de nanofibras de gelatina	46
Figura 15 Resultados de la interacción de parámetros de la síntesis de nanofibras de quitosano	47
Figura 16 Curvas Pareto de la síntesis de nanofibras	49
Figura 17 Esquema del método de spray pirólisis	53
Figura 18 Etapas de purificación y funcionalización de los NTC	54
Figura 19 Espectros de Infrarrojo de los NTC antes y después de su purificación y funcionalización	55
Figura 20 Imágenes SEM de a) la sección transversal de los NTC multicapa con los NTC adheridos al sustrato de cuarzo y b) película de NTC formada	56
Figura 21 Imágenes HR-TEM de los NTC sintetizados: (a) imagen de campo oscuro donde se muestra la presencia de hierro y (b) imagen ampliada de los NTC	57
Figura 22 Análisis termogravimétrico de los NTC sintetizados	58
Figura 23 Esquema representativo de nanofibras de colágeno/PVA	61
Figura 24 Fotografía (a) e imágenes SEM a diferentes magnificaciones (b, c, d, e) de la fibra colágeno-PVA	62
Figura 25 Espectro de infrarrojo para colágeno puro (a), alcohol polivinílico (PVA)	65
Figura 26 Análisis DSC del compuesto colágeno/PVA	67
Figura 27 Esquema representativo del compuesto colágeno-SC	68

Figura 28. Fotografía (a) e imágenes SEM a diferentes magnificaciones (b, c, d) de la fibra colágeno-sulfato de condroitina.	69
Figura 29 Espectro de infrarrojo para colágeno puro (a), Sulfato de condroitina (SC) puro (b) y el compuesto colágeno-SC (c).	72
Figura 30 Esquema representativo del compuesto colágeno-HA	73
Figura 31 Fotografía (a) e imágenes SEM de la fibra colágeno-ácido hialurónico a diferentes magnificaciones (b, c, d).	74
Figura 32 Espectro de infrarrojo para colágeno puro (a), Ácido hialurónico (HA) puro (b) y el compuesto colágeno-HA (c).	77
Figura 33 Esquema representativo del compuesto colágeno-PVA-SC	78
Figura 34 Fotografía (a) e imágenes SEM a diferentes magnificaciones (b, c, d) de la fibra colágeno-PVA-SC.	79
Figura 35 Espectro de infrarrojo para colágeno puro (a), Sulfato de condroitina, PVA (b) puro, (SC) puro (c) y el compuesto colágeno-PVA-SC (d).	82
Figura 36 Análisis DSC del compuesto colágeno/PVA-SC	83
Figura 37 Esquema representativo del compuesto colágeno-PVA-HA	84
Figura 38 Fotografía (a) e imágenes SEM a diferentes magnificaciones (b, c, d) de la fibra colágeno-PVA-HA.	85
Figura 39 Espectro de infrarrojo para colágeno puro (a), PVA (b) puro, (HA) puro (c) y el compuesto colágeno-PVA-HA (d).	88
Figura 40 Análisis DSC del compuesto colágeno/PVA-HA	89
Figura 41 Esquema representativo del compuesto colágeno-SC-HA	90
Figura 42 Fotografía (a) e imágenes SEM a diferentes magnificaciones (b, c, d) de la fibra colágeno-SC-HA.	91
Figura 43. Espectro de infrarrojo para colágeno puro (a), Sulfato de condroitina, (SC) puro (b), (HA) puro (c) y el compuesto colágeno-SC-HA (d).	94
Figura 44 Análisis DSC para compuesto colágeno-SC-HA	95
Figura 45 Esquema representativo del compuesto colágeno-PVA-SC-HA.	96
Figura 46 Fotografía (a) e imágenes SEM a diferentes magnificaciones (b, c, d) de la fibra colágeno-PVA-SC-HA.	97
Figura 47 Espectro de infrarrojo para colágeno puro (a), PVA (b), (SC) puro (c), (HA) puro (d) y el compuesto colágeno-PVA-SC-HA (e).	98
Figura 48 Esquema representativo del compuesto colágeno-PVA-SC-NTC	100
Figura 49 Imagen a) fotográfica y b) SEM del compuesto colágeno-PVA-SC-NTC.	101
Figura 50 Espectro de infrarrojo para colágeno puro (a), (SC) puro (b), (NTC) puro (c) y el compuesto colágeno-SC-NTC (d).	103
Figura 51 Análisis DSC del compuesto colágeno/PVA-SC-NTC	104
Figura 52 Esquema representativo del compuesto colágeno-PVA-SC-HA--NTC	105

Figura 53 Fotografía del compuesto colágeno-PVA-SC-NTC	106
Figura 54 Espectro de infrarrojo para colágeno puro (a), (SC y HA) puro (b), (NTC) puro (c) y el compuesto colágeno-SC-NTC (d)	108
Figura 55 Resultados de la prueba de hinchamiento de las nanofibras	110
Figura 56 Esquema representativo de la caracterización biológica de los nanomateriales.	116
Figura 57 Diseño de experimentos para el cultivo de células en los materiales	117
Figura 58 Fotografías de células HT29 sembradas a una concentración de 100000 células /pozo a las 24, 48, 72 y 144 horas y representación gráfica de la confluencia observada.	118
Figura 59 Disposición del diseño de experimentos para el cultivo de células en material polimérico.	121
Figura 60 Resultados de adhesión celular con azul de toluidina respecto del control positivo.	126
Figura 61 Resultados de adhesión celular con azul de toluidina respecto del control negativo.	127
Figura 62 Resultados de adhesión celular con cristal violeta con respecto al control positivo.	129
Figura 63 Resultados de adhesión celular con cristal violeta con respecto al control negativo.	129
Figura 64 Células HT29 sembradas a) en cajas matraz de fondo plano y b) las cajas de 96 pozos	131
Figura 65 Caja de 96 pozos después del ensayo MTT de células HT29 ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 66 Células HT29 a) antes y b) después del ensayo MTT	132
Figura 67 Resultados del ensayo MTT en células HT29.	133
Figura 68 Resultados de MTT (Densidad óptica)	135
Figura 69 Resultados de MTT (% de viabilidad)	135
Figura 70 Resultados de MTT (concentración celular)	136
Figura 77 Conteo de células por exclusión con azul de Tripano mediante un Hematocitómetro	137

LISTA DE TABLAS

		<i>Página.</i>
Tabla 1	Métodos de síntesis de nanotubos de carbono (NTC)	16
Tabla 2	Variables para la síntesis de nanotubos de carbono presentados en el caso de estudio.	20
Tabla 3	Fuente de carbono, catalizador y flujo de gas para cada método de síntesis del caso de estudio.	20
Tabla 4	Correlaciones para el costo y eficiencia para cada método de síntesis.	21
Tabla 5	Correlaciones para el costo y eficiencia para cada método de síntesis.	21
Tabla 6	Correlaciones de toxicidad para cada método de síntesis.	22
Tabla 7	Variables de optimización del electrohilado en el caso de estudio.	37
Tabla 8	Costos unitarios de los polímeros y solventes utilizados.	39
Tabla 9	Potencia y electricidad de los equipos utilizados en el proceso de electrohilado.	40
Tabla 10	Resultados de la optimización.	48
Tabla 11	Materiales y Equipos empleados para la síntesis de nanotubos de carbono.	50
Tabla 12	Materiales y Equipos empleados para la síntesis de las nanofibras poliméricas.	57
Tabla 13	Preparación de las soluciones poliméricas	57
Tabla 14	Diseño de experimento para la síntesis de nanofibras poliméricas.	58
Tabla 15	Condiciones de electrohilado para la síntesis de las nanofibras.	58
Tabla 16	Grupos funcionales en los espectros IR de colágeno y PVA	61
Tabla 17	Grupos funcionales en los espectros IR de colágeno y SC	68
Tabla 18	Grupos funcionales en los espectros IR de colágeno y HA	74
Tabla 19	Materiales y equipos utilizados en la síntesis de películas delgadas.	99
Tabla 20	Índice de hinchamiento de los nanomateriales obtenidos.	110
Tabla 21	Tiempos de disolución de los nanomateriales obtenidos a diferentes pH.	111
Tabla 22	Comparación de las propiedades de los nanomateriales obtenidos.	112
Tabla 23	Materiales y equipos para el análisis biológico de las nanofibras.	119

Tabla 24	Confluencia del crecimiento de células HT29 sobre los materiales poliméricos estudiados.	122
Tabla 25	Resultados de adhesión de azul de Toluidina.	125
Tabla 26	Resultados de adhesión de cristal violeta.	127
Tabla 27	Resultados preliminares de ensayo MTT.	132
Tabla 28	Resultados de viabilidad por ensayo MTT.	133
Tabla 29	Diseño de primers por RT-PCR para células HT29	154

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

°C	Grados centígrados
μl	Micro litro
μm	Micrómetro
C ⁻	Control negativo
C ⁺	Control positivo
CAM	Moléculas de adhesión
CL	Colágeno
cm ³	Centímetros cúbicos
DMEM	Suero reducido de medios
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
gr	Gramo
H	Grado de hinchamiento
HA	Ácido Hialurónico
HR-TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
K/minuto	Grado kelvin por minuto
LD ₅₀	Dosis letal media
mL	Mililitro
MTT	Ensayo colorimétrico para viabilidad celular
MWCNT	Nanotubos de carbono de pared múltiple
nm	Nanómetro
NTC	Nanotubos de carbono
PVA	Alcohol Polivinílico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SC	Sulfato de Condroitina
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
SWCNT	Nanotubos de Carbono de Pared Sencilla
T _C	Temperatura de cristalización
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
T _F	Temperatura de fusión
T _g	Temperatura de transición vítrea
TGA	Análisis Termogravimétrico
W _F	Peso final después de sumergir en liquido
W _O	Peso inicial antes de sumergir en liquido

Capítulo I INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la síntesis de los nanomateriales se ha convertido en un área de gran interés en la ciencia de los nanomateriales debido a las novedosas aplicaciones biomédicas que presentan éstos compuestos dadas sus propiedades físicas y químicas. Por tal razón, muchos de los estudios se han centrado en la optimización de sus métodos de síntesis, la cual, consiste en encontrar las mejores condiciones de operación para obtener el resultado deseado. Al respecto, es importante emplear métodos de optimización que permitan manipular una gran cantidad de variables y restricciones para determinar la solución óptima de un problema dado. Particularmente, las formulaciones de programación disyuntivos permiten fácilmente representar un problema complejo combinatorio.

Dentro de los biomateriales más utilizados se encuentran las nanofibras. Los parámetros empleados para su fabricación no solamente determinan sus propiedades físicas finales como la biocompatibilidad, la biodegradabilidad y la estabilidad mecánica, sino también proveen las señales apropiadas para procesos de crecimiento celular, por ende, es de suma importancia el determinar las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y biológicas de dichos materiales. Por otro lado, los nanotubos de carbono son nanomateriales que han alcanzado su auge debido al gran número de aplicaciones que pueden tener de acuerdo a sus características físicas, químicas y mecánicas, las cuales dependen ampliamente de los métodos de síntesis y las variables involucradas.

Actualmente, la optimización de los procesos de síntesis de nanomateriales se ha centrado en análisis experimentales de las variables involucradas, realizando modificaciones de las mismas a nivel laboratorio y encontrando sus óptimos a partir de experimentos de prueba y error, sin tomar en cuenta el costo y mucho menos aspectos de seguridad implícitos en los métodos y reactivos empleados para tal fin. Es así, que se hace necesario contar con métodos de optimización teóricos en los que puedan relacionarse variables de optimización en torno a la calidad de los materiales sintetizados, su rendimiento, seguridad y costo. De tal forma, que a partir de estos estudios es posible seleccionar los parámetros más adecuados para su implementación en la síntesis experimental de estos materiales, los cuales pueden finalmente evaluados respecto de su

biocompatibilidad y citotoxicidad para determinar su potencial uso en aplicaciones biomédicas.

El presente trabajo se ha centrado en tres objetivos principales; el primero es la optimización de los procesos de síntesis de los nanomateriales en torno a su calidad, rendimiento, seguridad y costo. Se presenta la optimización de la síntesis de nanotubos de carbono tomando en cuenta su producción mediante los métodos de descarga de arco, ablación láser y deposición química en fase vapor, así mismo, se ha optimizado el procesamiento de soluciones poliméricas para la producción de materiales compuestos en forma de nanofibras mediante el método de electrohilado. El segundo objetivo es la síntesis y caracterización de materiales compuestos base colágeno en forma de nanofibras. Los materiales sintetizados fueron nanofibras de diversas mezclas de colágeno tipo II, alcohol polivinílico, ácido hialurónico y sulfato de condroitina cargadas con nanotubos de carbono (NTC); la incorporación de colágeno en la matriz polimérica y la interacción con los NTC se ha estudiado mediante espectroscopia de infrarrojo (IR), mientras que la morfología y topología de las nanofibras compuestas finales se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Adicionalmente, se analizó la capacidad de absorción de agua y el índice de hinchamiento de dichos materiales, además de determinar la temperatura de transición vítrea (T_g) y la estabilidad térmica de cada combinación mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Finalmente, el tercer objetivo fue la evaluación de la biocompatibilidad y citotoxicidad de estos materiales sobre células de la línea celular HT29 derivadas de adenocarcinoma de colon, el análisis de biocompatibilidad se realizó mediante estudios de adhesión con azul de Toluidina y Cristal violeta, mientras que la citotoxicidad-viabilidad mediante el ensayo colorimétrico para viabilidad celular, MTT.

Los resultados muestran que mediante la optimización matemática es posible determinar las condiciones óptimas de operación para la síntesis de nanomateriales lo cual se refleja en un mayor rendimiento y mejor calidad del material obtenido mediante un proceso seguro y económico. Con lo que respecta a las aplicaciones biomédicas se concluyó que el compuesto de colágeno/alcohol polivinílico-sulfato de condroitina en forma de nanofibras es el que posee mejores propiedades físicas, químicas y biológicas para ser utilizado como matriz de crecimiento de células HT29; mientras que, la mediante la incorporación de nanotubos de carbono a esta combinación se obtiene un material incompatible con las células HT29.

1.1 Generalidades

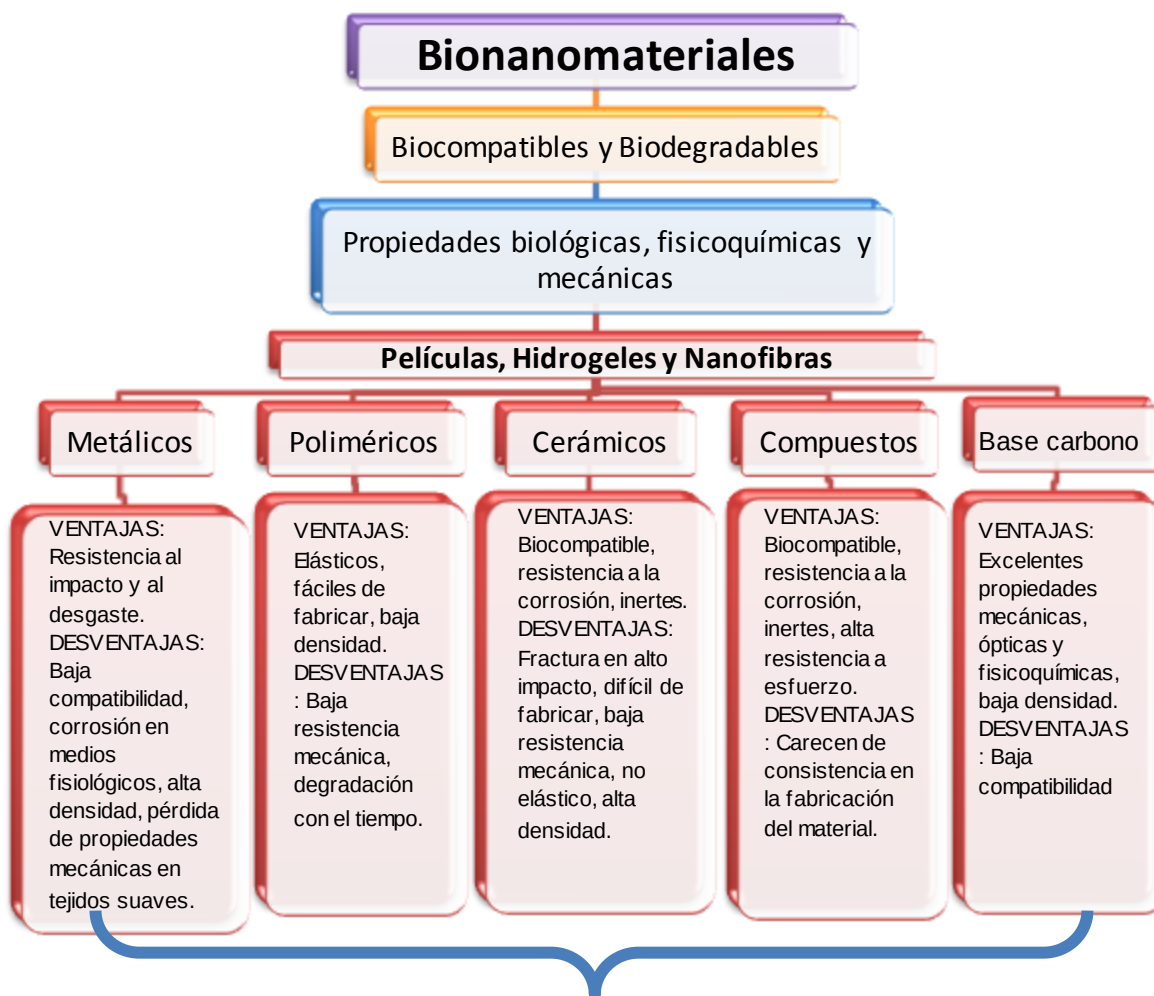
El desarrollo de nuevos materiales implica la generación y aplicación del conocimiento en muchas áreas, así como la optimización de nuevos procesos de síntesis de materiales capaces de sustituir parcial o totalmente la función de algún órgano del cuerpo humano, los cuales son llamados biomateriales (1-4).

A nivel nanométrico los materiales poseen propiedades físico-químicas específicas que pueden diferir de las propiedades de dichos materiales a escala macroscópica o con tamaños de partículas de mayores dimensiones, los biomateriales que poseen escalas nanométricas se denominan bionanomateriales.

Los nanomateriales pueden ser clasificados de acuerdo a la Figura 1. Pueden estar constituidos por metales, cerámicos, polímeros, carbono o combinaciones de ellos, y deben de cumplir con las condiciones de partida de ser **bioestables**, esto es, con carácter permanente, particularmente útiles, para sustituir parcial o totalmente tejidos u órganos, ser **biodegradables**, esto es, con carácter temporal, por tanto, con una funcionalidad adecuada durante un tiempo limitado, el necesario mientras el problema subsista, y ser **biocompatibles** y asegurar una determinada vida media. A su vez, tienen que aportar los beneficios específicos que requiera la aplicación para la que sean destinados (2; 5).

Los nanomateriales de manera general pueden obtenerse en forma de nanofibras (3D), hidrogeles y películas (2D), las películas delgadas son capas de materiales delgados con dimensiones que van desde algunos cuantos nanómetros hasta algunos cientos de micrómetros, las cuales son creadas por condensación una a una de materia, como átomos o moléculas (6), un hidrogel se utiliza para describir las estructuras de redes poliméricas entrecruzadas, estos son obtenidos a partir de polímeros naturales y/o sintéticos, capaces de absorber y retener grandes cantidades de agua. La estructura de hidrogel es creada por los grupos o dominios presentes en una red polimérica que son hidratados en medio acuoso (4). Finalmente, las nanofibras son estructuras nanométricas en forma de fibras, tubos, cintas, anillos, varillas y cables, que dada su escala presentan propiedades

nuevas que no están presentes en estructuras de igual composición y tamaño macroscópico (7; 8).



APLICACIONES

Figura 1 Esquema representativo de la clasificación de los Nanomateriales.

1.1.1 Biopolímeros definición, propiedades y clasificación.

Un biopolímero es un polímero natural o sintético cuyo fin es el de interactuar con un sistema biológico. Evaluar, curar, corregir o reemplazar algún tejido, órgano o función del organismo son las posibles interacciones entre el biopolímero y el ser vivo.

Los biopolímeros naturales, como ejemplo una proteína, están constituidos por cadenas que se organizan formando una estructura característica y única para cada biopolímero. Esta estructura es un parámetro característico del biopolímero que se denomina estructura primaria. La función biológica viene determinada por la estructura secundaria y terciaria. Los polímeros sintéticos tienen una estructura más simple y aleatoria, lo que deriva en una distribución de masa molecular, la cual en los biopolímeros no existe.

Los polímeros son mucho más blandos que los metales y, en cuanto a su conductividad térmica, son mejores aislantes que los cerámicos, además ofrecen la posibilidad de fabricarlos de muy distintas maneras, con características bien determinadas, y con facilidad de conformarlos en fibras, tejidos, películas o bloques (1; 9-11).

Entre las principales propiedades que debe cumplir un biopolímero para poder ser aplicado en biomedicina son:

- Ser biocompatible, bioinerte o bioactivo.
- Poseer una adecuada resistencia mecánica
- Tener propiedades físicas adecuadas (densidad)
- Buena estabilidad térmica
- Ser No tóxico

La Figura 2 muestra un esquema de los principales polímeros empleados en la síntesis de nanomateriales.

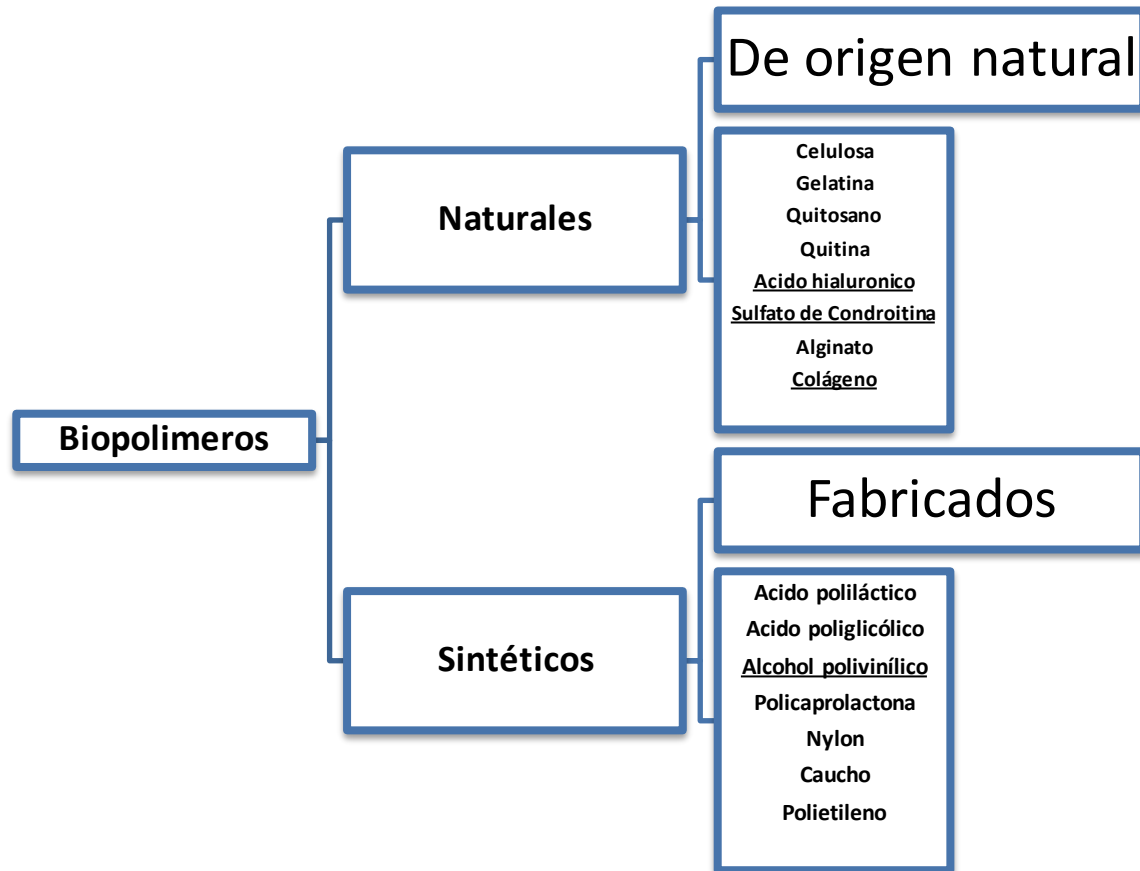


Figura 2 Esquema representativo de la clasificación de los biopolímeros.

El colágeno, el quitosano, el ácido hialurónico y el sulfato de condroitina son en mayor proporción los biopolímeros de origen natural más empleados para la síntesis de materiales compuestos de diversas morfologías debido a que poseen una amplia gama de propiedades deseables en diversas aplicaciones biomédicas. Mientras que los ácidos poli láctico y poliglicólico y el alcohol polivinílico son los polímeros sintéticos de mayor uso para el mismo fin, sin embargo, el costo de los primeros dos puede ser una limitante importante para su uso en la síntesis de biomateriales.

1.1.2 Colágeno

El colágeno es una proteína que posee diferentes niveles de orden estructural: primario, secundario, terciario y cuaternario. Es la proteína más

abundante en el reino animal, componente principal en la matriz extracelular y en los tejidos conectivos.

En los tejidos humanos se conocen alrededor de 16 tipos de colágeno diferentes, siendo los más abundantes y por lo tanto los más estudiados el de tipo I, presente en hueso, el de tipo II, presente en cartílago hialino y el de tipo III, presente en piel. La naturaleza común de todos estos tipos de colágenos es la configuración espacial de triple hélice de su estructura molecular, cada una formada por el enrollamiento de tres cadenas unidas entre sí. Estas cadenas presentan uniones intramoleculares y extramoleculares, las cuales mantienen el entrecruzamiento molecular, requisito necesario para que las fibras de colágeno puedan resistir el impacto al que son sometidas. La triple hélice del colágeno surge como consecuencia de las interacciones entre los tres aminoácidos que componen las cadenas polipeptídicas: glicina, prolina e hidroxiprolina (ver Figura 3).

El colágeno se aísla a partir de tejidos animales, principalmente, aunque existen alternativas al origen animal ya que puede ser producido por tecnologías recombinantes (aunque todavía presentan un alto costo). Además, el colágeno es difícil de procesar y su degradación es muy difícil de controlar.

El colágeno es considerado por muchos como una plataforma o matriz ideal en ingeniería de tejidos, ya que es el principal componente proteico de la matriz extracelular y por su prestación de apoyo a diferentes tejidos conectivos. Se define por su alta resistencia mecánica, estabilidad térmica, biocompatibilidad, baja antigenicidad, biodegradabilidad, capacidad para participar en interacciones específicas, etc. Esto hace que se emplee en un gran número de aplicaciones biomédicas (2; 12-14).

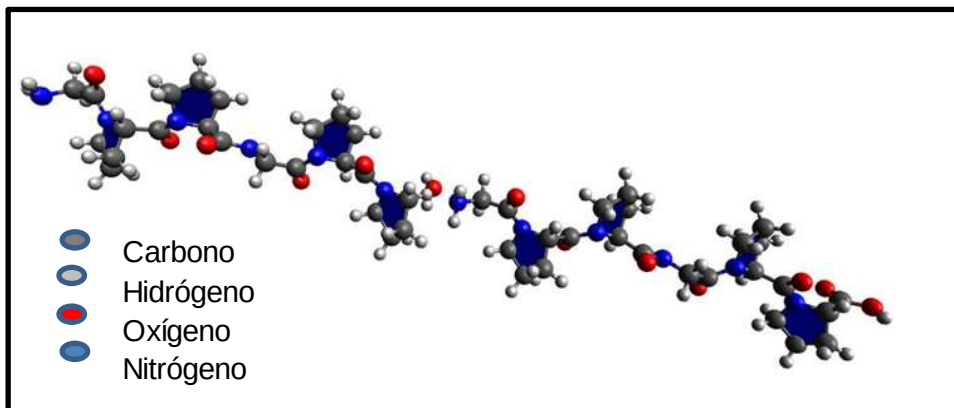


Figura 3 Estructura molecular del colágeno.

1.1.3 Alcohol Polivinílico (PVA)

El alcohol polivinílico o polivinil alcohol es un polímero biodegradable de gran interés por su carácter biocompatible, no tóxico y por poseer diversas aplicaciones tales como: la producción de fibras, coloides de protección, agentes de apresto para textiles y papel, adhesivos, fibras de sutura útiles en cirugía, membranas, entre otras (15; 16). Estas propiedades vienen conjuntamente con una versatilidad química notable debido a la presencia de los grupos hidroxilo, que hacen posible un número de injertos y reacciones de reticulación de la cadena principal del polímero como se observa en la siguiente (Figura 4).

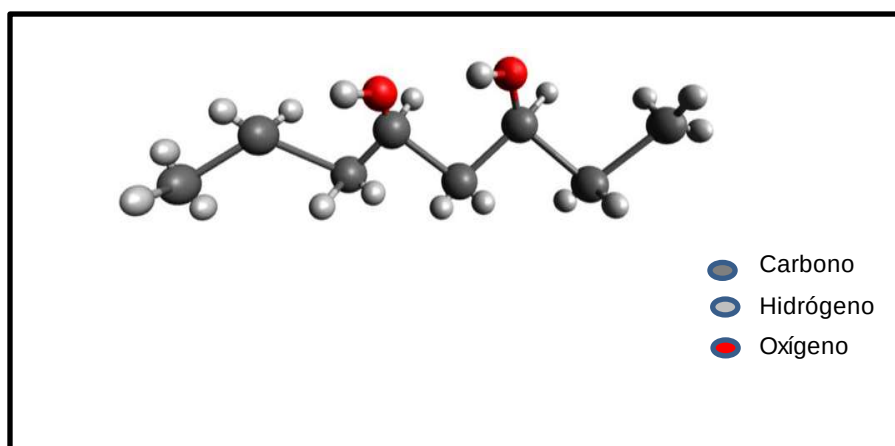


Figura 4 Estructura química del alcohol polivinílico (PVA).

1.1.4 Sulfato de Condroitina (SC).

El sulfato de condroitina es un glucosaminoglucano sulfatado compuesto por una cadena de disacáridos de N-acetilgalactosamina y N-ácido glucurónico alternados (Ver Figura 5).

El sulfato de condroitina se encuentra habitualmente asociado a proteínas constituyendo agregados de alto peso molecular denominados proteoglicanos. Es un importante componente de la mayoría de los tejidos de vertebrados e invertebrados y está presente principalmente en aquellos que poseen una gran matriz extracelular, como los que forman los tejidos conectivos del cuerpo, cartílago, piel, vasos sanguíneos, así como los ligamentos y los tendones. El sulfato de condroitina aporta al cartílago sus propiedades mecánicas y elásticas, y le proporciona a este tejido mucha de su resistencia a la compresión por lo que es ampliamente utilizado en aplicaciones biomédicas como en ingeniería de tejidos (17-19).

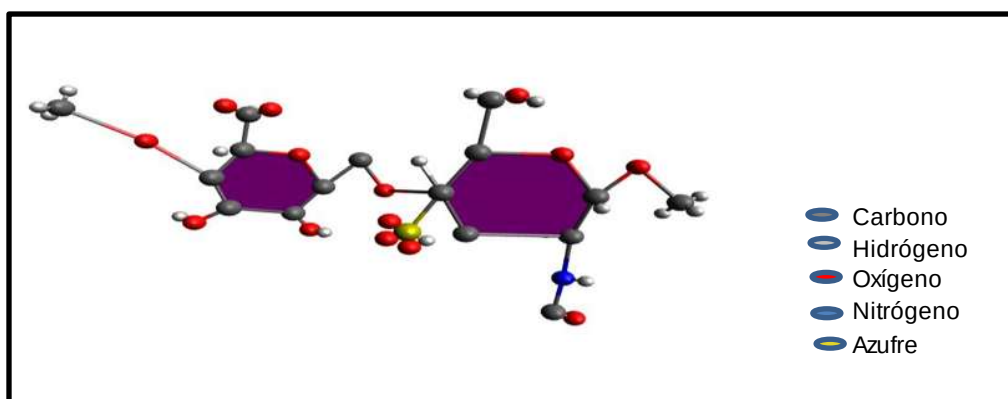


Figura 5 Estructura química del sulfato de condroitina (SC).

1.1.5 Ácido Hialurónico (HA)

El ácido hialurónico (AH) es un polisacárido del tipo de glucosamino glucanos con enlaces β , que presenta función estructural, como los sulfatos de condroitina (Ver Figura 6). De textura viscosa, existe en la sinovia, el humor vítreo y el tejido conjuntivo colágeno de numerosos organismos, además de que es un

importante glucosaminoglucano en la homeostasis articular. En seres humanos destaca su concentración en las articulaciones, los cartílagos y la piel.

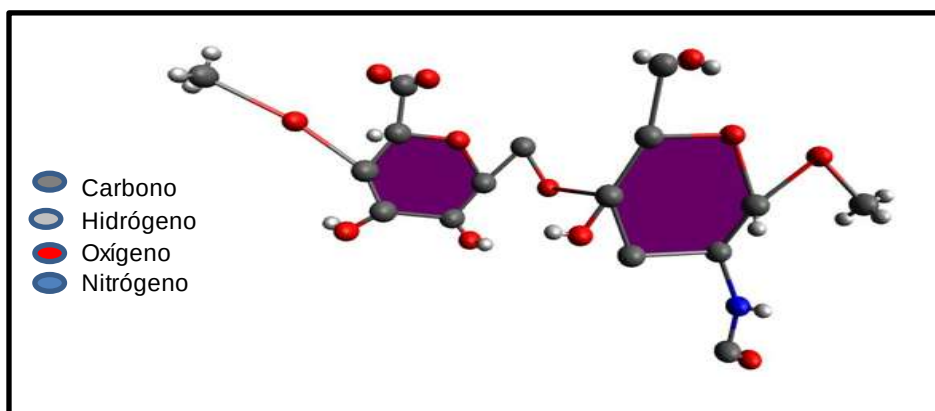


Figura 6 Estructura química del ácido hialurónico (HA).

Debido a que es un polímero natural, no tóxico, biodegradable y biocompatible, es ampliamente en biomedicina para la restauración de cartílago, hueso, saneamiento de heridas, entre muchas otras más (18-20).

Las nanofibras poliméricas constituyen un papel importante en los nuevos avances tecnológicos de biomedicina debido a que son materiales con gran área superficial lo que aporta excelentes propiedades mecánicas superiores comparadas con cualquier material y la facilidad de adición de grupos funcionales en la superficie (8; 21; 22), poseen alta porosidad lo que facilita el transporte de material entre las células, Las nanofibras de colágeno son de particular interés e importancia en biomedicina, debido a que además de ser un material con propiedades nanométricas posee las características del biopolímero, como son, biocompatibilidad, biodegradabilidad, no tóxico y precursor del crecimiento celular. A pesar de que se tienen varios trabajos de la síntesis de nanofibras de colágeno tipo II, es importante remarcar que en ninguno de ellos se ha abordado la optimización del procesos de Electrospinning para la síntesis de éstos materiales, lo cual, es de suma importancia debido a que mediante ellos se pueden abordar el efecto de cada una de las variables de proceso (voltaje, concentración, velocidad de inyección, temperatura y distancia, etc.), las cuales influyen de manera

primordial en el diámetro y calidad de la fibra lo cual es de vital importancia para las aplicaciones biomédicas de dichos materiales; por lo tanto, si se lleva a cabo la optimización de éstos materiales antes de ser sintetizados, podemos definir el valor de cada una de éstas variables y así obtener los materiales con las características deseadas de manera eficaz ahorrando tiempo y costos porque se evitarían experimentos fallidos y desperdicio de materias primas.

A partir de la década pasada las nanofibras han recibido un renovado interés debido a su elevada área superficial y alta porosidad. El Electrospinning se define de manera general como el proceso de producir fibras haciendo uso de un campo eléctrico, el cual actúa sobre las cargas inducidas en una solución polimérica. Este proceso consta de distintas etapas, desde el bombeo de la solución polimérica al electrodo (aguja) hasta la etapa final de recolección de fibras (7). Esta técnica emplea fuerzas eléctricas para producir fibras de polímeros con diámetros en la escala nanométricas y de longitudes variables (19; 22). La optimización del proceso Electrospinning para la síntesis de nanofibras ha sido estudiado debido a la gran cantidad de parámetros que influyen en las características finales de la fibra obtenida (8; 23; 24).

Por otro lado, los nanotubos de carbono (NTC) han alcanzado auge en un gran número de aplicaciones debido a que integran excelentes propiedades ópticas, térmicas, fisicoquímicas, mecánicas y eléctricas que poseen. Existen diferentes métodos de síntesis de estos nanomateriales entre los que destacan descarga de arco, deposición de fase vapor, ablación laser, entre otros. Recientemente, se ha promovido el interés por la optimización de los procesos de síntesis de los NTC para obtener las características deseadas a menor costo y de manera segura de estos nanomateriales (25-27).

Una vez obtenidos los nanomateriales mediante el proceso optimizado, un nuevo reto al que se enfrenta es el dar una aplicación potencialmente útil. Las aplicaciones biomédicas son las favoritas para este de biomateriales debido a sus características únicas que poseen por las escalas nanométricas similares al material extracelular de las células. Por esta razón, en las últimas décadas, los

nanomateriales han tenido auge como posibles candidatos para mejora de materiales tradicionales utilizados en aplicaciones biomédicas.

1.1.6 Nanofibras poliméricas base colágeno tipo II

Se sabe que de manera natural el cuerpo humano contiene un alto nivel de colágeno tipo II, mayormente se encuentra en tejidos fibrosos como tendones, ligamentos y piel, el cual se ha utilizado como uno de los principales componentes fibrosos para la síntesis de biomateriales. El colágeno es fácilmente degradado y absorbido por el cuerpo, lo que lleva a una buena adhesión a las células, aunque tiene menos resistencia mecánica ($E \sim 100$ MPa) que el hueso ($E \sim 2$ GPa), por esta razón, el colágeno se utiliza a menudo como un material compuesto y se mezcla con otros materiales tales como cerámicas hidroxiapatita (14), polímeros naturales como el sulfato de condroitina (18), ácido hialurónico (28), gelatina (29), seda (13), y polímeros sintéticos como PVA (30) y poli (ε-caprolactona) (31), así como algunos polisacáridos como quitosano y alginato (29; 32).

Se han sintetizado nanomateriales a partir de colágeno en forma de nanofibras, los cuales son candidatos potenciales para aplicaciones biomédicas, combinando al colágeno con otros polímeros con el fin de fortalecer u obtener materiales con mejores características fisicoquímicas y de biocompatibilidad (33-36).

En 2012, Huilin Tian et al. estudiaron las interacciones que existen entre el colágeno y el sulfato de condroitina por medio de espectroscopia de infrarrojo, ellos definieron que dichas interacciones se dan entre los grupos hidroxilos del sulfato de condroitina y los grupos C=O del colágeno, además de la interacción electrostática entre los grupos carboxilos del sulfato de condroitina y los grupos amino del colágeno (37).

En 2013, Yu et al. estudiaron el grado de desintegración de colágeno a partir de nanofibras de colágeno/alginato/quitosano/HA en solución. La desintegración del 35% se observa después de 10 días (38).

En 2014, Vozzi et al. sembraron un osteoblasto primario sobre el biomaterial colágeno/gelatina/genipina e investigaron la adhesión celular y la proliferación, después de 3, 7, 15, y 21 días. Ellos concluyeron que la proliferación celular aumentó con el tiempo en el cultivo (máximo a los 21 días) y que las células de osteoblastos primarios se disponen como monocapa, mientras que su forma celular está muy aplanada en nanofibras de colágeno (39).

En 2015, Ho Jun Jeon et al. sintetizaron nanofibras de poli (ε-caprolactona) /colágeno tipo I, demostrando su biocompatibilidad y viabilidad con células humanas tipo osteoblastos (MG63) (40).

En 2016, Xiaoli Zhang et al. Prepararon nanofibras de Colágeno/PVA mediante electrospinning, ellos emplearon radiación UV y glutaraldehído para promover el entrecruzamiento entre colágeno y PVA y mostraron su eficiencia para la liberación de fármacos utilizando como modelo el ácido salicílico (36).

1.1.7 Nanofibras poliméricas reforzadas con Nanotubos de Carbono

Las nanofibras integradas por nanotubos de carbono (NTC) y una red polimérica son nanomateriales multifuncionales muy atractivos, debido a que es posible combinar las características mecánicas y electrónicas de sus componentes individuales, con lo cual es posible mejorar sus propiedades mecánicas (41), eléctricas y térmicas (25; 42; 43).

Las nanofibras de NTC/polímero han demostrado ser atractivas para un sin fin de aplicaciones potenciales. Entre las principales aplicaciones de las nanofibras de NTC/polímero es la ingeniería de tejidos (31; 44), la restauración de hueso (45), los sensores químicos (46), la liberación de fármacos (44; 47) , entre muchos más.

Los NTC son considerados excelentes refuerzos para las nanofibras poliméricas debido a sus inigualables propiedades mecánicas, su alta estabilidad química y térmica, su buena conductividad eléctrica y su excelente conductividad térmica (13; 48; 49).

En 2013, Brakmane et al. desarrollaron un nuevo dispositivo utilizando nanotubos de carbono de pared única (SWCNT) y puntos cuánticos (QDs) para la detección temprana del cáncer de células, con la opción de entregar un tratamiento específico (50). Pei-Chi Lee et al. en el mismo año estudiaron la conjugación de MWNTC con anticuerpos para la detección de células cancerígenas y transportar fármacos hacia el interior de éstas células (7).

1.1.8 Optimización de los procesos de síntesis de nanomateriales y sus posibles aplicaciones

La optimización consiste en encontrar las mejores condiciones para obtener el resultado deseado, la programación matemática ha sido ampliamente utilizada para afinar diferentes procesos. Debido a que tiene la ventaja de que permite manipular una gran cantidad de variables y restricciones para determinar la solución óptima de un problema dado. Particularmente, las formulaciones de programación disyuntivos permiten fácilmente representar un problema complejo combinatorio, y estas formulaciones se han probado en diversos problemas con aplicación en ingeniería (42).

Actualmente el mundo está volcado al estudio, desarrollo y búsqueda de aplicación de los nanomateriales, pero la optimización de los procesos de síntesis de estos materiales es del mismo modo de suma importancia y el contar con modelos matemáticos adecuados de la síntesis de bionanomateriales por diferentes métodos sería de gran ayuda para el diseño, escalamiento, operación y optimización del proceso.

De manera importante, se ha determinado que los materiales a escala nanométrica exhiben propiedades superiores de compatibilidad celular, mecánicas, eléctricas, ópticas, catalíticas y magnéticas comparada con los materiales convencionales (o microestructuras), entre las que destacan las siguientes: Restauración de cartílago, Saneamiento de heridas, Liberación de fármacos, Restauración de hueso, Catálisis, Cosmética y Estética, Restauración de piel y tendones, etc. (8; 51).

1.2 Justificación

Hoy en día, los nanomateriales, debido a su tamaño nanométrico y su alta área superficial se han convertido en un campo emergente que ha mostrado una gran promesa en el desarrollo de nuevos agentes de diagnóstico, de formación de imágenes y terapéuticos para una variedad de enfermedades, incluyendo el cáncer. La ciencia de los materiales ha crecido mucho, por lo que se ha hecho necesaria una clasificación práctica que es de gran utilidad para distinguir a los materiales con base en sus funciones principales, ya sean mecánicas (estructurales), biológicas, eléctricas, magnéticas u ópticas. Los nanomateriales son ampliamente empleados para usos biomédicos, entre los más utilizados se encuentran las nanofibras poliméricas las cuales poseen diámetros nanométricos y constituyen un escenario versátil para un amplio número de aplicaciones en diversas áreas en las que se destacan las aplicaciones biomédicas. La producción de nanofibras por medio de la técnica de electrohilado, ha aumentado significativamente en la última década debido a que es una técnica relativamente sencilla, sin embargo, este proceso involucra una cantidad considerable de parámetros que influyen en las propiedades del producto final. Asimismo, los nanotubos de carbono se han convertido en materiales clave para un gran número de aplicaciones biomédicas, no obstante, su síntesis a bajo costo, de manera segura y con las características finales deseadas es un factor clave para el escalamiento y procesamiento de dichos materiales. Es así, que la síntesis de nanomateriales se ha convertido en una rama de estudio de suma importancia debido que cada día son más exigentes las características necesarias del biomaterial para poder ser utilizado con fines biomédicos, por esta razón en los últimos años se ha hecho necesario considerar procesos de obtención de manera económica, segura y con mayor rendimiento, pero sin perder las cualidades necesarias del material, es así que la optimización de sus procesos de producción considerando estos aspectos es altamente necesaria para posteriormente realizar su síntesis de una manera efectiva que permita la obtención de nanobiomateriales altamente biocompatibles y no tóxicos para el crecimiento celular

1.3 Hipótesis

El estudio de las variables de proceso de síntesis de nanomateriales permitirá optimizar el método síntesis y obtener los nanomateriales base colágeno tipo II y nanotubos de carbono con excelentes características de biocompatibilidad y baja citotoxicidad en células HT29.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Optimizar la síntesis de nanomateriales compuestos base colágeno tipo II en forma de nanofibras y reforzados con nanotubos de carbono para su caracterización fisicoquímica y evaluar su biocompatibilidad y citotoxicidad mediante el cultivo de células HT29.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Optimizar la síntesis de los NTC.
2. Purificar y funcionalizar los NTC obtenidos.
3. Montaje y optimización de las variables de procesos del equipo electrospinning para la síntesis de nanofibras.
4. Obtener nanofibras poliméricas mediante la técnica de electrohilado a partir de diferentes combinaciones de colágeno, alcohol polivinílico, sulfato de condroitina y ácido hialurónico.
5. Incorporar los nanotubos de carbono (NTC) a la combinación polimérica y obtener los materiales compuestos.
6. Caracterizar los nanomateriales obtenidos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopia de infrarrojo (IR), análisis termogravimérico y calorimetría diferencial de barrido (TGA y DSC), grado de hinchamiento y sensibilidad al pH.
7. Evaluar la biocompatibilidad de los nanomateriales mediante cultivo celular in vitro con la línea celular HT29 de cáncer de colon.

Capítulo II OPTIMIZACIÓN TEÓRICA DE LOS MÉTODOS DE SÍNTESIS DE NANOMATERIALES

El éxito de un biomaterial biocompatible está ligado intrínsecamente con el mejoramiento de sus propiedades superficiales, ya que es la superficie la que estará en contacto directo con el sistema vivo en caso de ser implantado, y dichas propiedades pueden ser monitoreadas y determinadas mediante un análisis detallado de las variables de proceso de síntesis de dichos materiales nanométricos. Todo esto permite que dichos materiales, puedan ser manipulados química y físicamente en forma útil y sus propiedades y dimensiones finales dependen en gran medida de los parámetros y de la naturaleza del método utilizado para su síntesis. Varios parámetros clave y condiciones de operación tienen que ser manipulados para producir estos nanomateriales con propiedades adecuadas para aplicaciones futuras, y es evidente que todos estos métodos de síntesis de cualquier material deben ser optimizados.

En ésta sección se analizará la optimización de los métodos de síntesis de nanomateriales, en lo que se incluyen el electrohilado para la síntesis de nanofibras poliméricas y tres métodos de síntesis de nanotubos de carbono (descarga de arco, ablación láser y deposición química en fase vapor); en los cuales se consideraran las características deseadas del nanomaterial final para determinar las condiciones de operación a un costo moderado y con la máxima seguridad en el proceso.

2.1 Optimización matemática de la síntesis de nanotubos de carbono

2.1.1 Los Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono son sistemas huecos formados por láminas de grafito enrolladas, de diámetros nanométricos y longitudes del orden de las micras. Son materiales únicos con propiedades mecánicas, eléctricas, ópticas, térmicas y químicas excepcionales que los hacen aptos para mejorar numerosos productos ya existentes e incluso para generar otros nuevos (45; 52; 53).

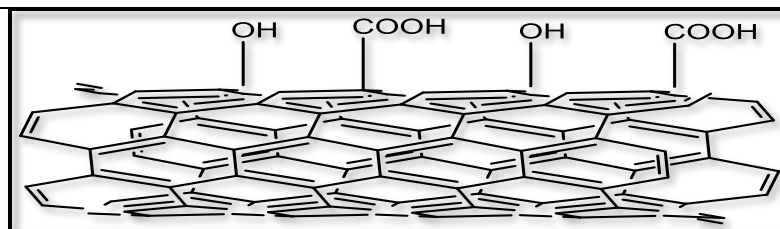


Figura 7 Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT – Single Wall Carbon Nanotubes) están constituidos por átomos de carbono dispuestos en una red hexagonal cilíndrica, de forma que su estructura es la misma que se obtendría si se enrollara sobre sí misma una lámina de grafito. Los nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT – Multiwall Carbon Nanotubes) tienen una estructura similar a varios SWCNT concéntricos con diferentes diámetros (Figura 7).

Existen diferentes métodos de síntesis de NTC, a partir de los cuales es posible producir las diferentes estructuras de los mismos; en forma de vapor crecido, fibras de carbono y diferentes tipos de materiales nano estructurados de carbono (53). Entre los métodos más destacados se encuentran la descarga de arco, la ablación láser, la deposición química en fase vapor (CVD), la pirólisis de hidrocarburos, microondas, entre otros. Las principales características de estas metodologías, así como las características del producto final se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1 Características principales de los métodos de síntesis de nanotubos de carbono (NTC) y características del producto final.

Método	Características	Producto
Descarga de Arco	Económico. Se requiere el uso de un catalizador metálico.. Se produce la condensación de átomos de carbono por la evaporación de grafito haciendo uso de una descarga eléctrica	Se obtienen nanotubos cortos con diámetros de 0.6 a 1.4 nm y con pocos defectos estructurales

Ablación láser	Costoso. Se produce la condensación de átomos de carbono por la evaporación de grafito haciendo uso de temperaturas entre 3000 y 4000 °C mediante un láser de alta potencia.	Se obtienen nanotubos de 5 a 20 μm con diámetros de 1 a 2 nm y con pocos defectos estructurales
Deposición Química en fase vapor	Simple y económico. Se produce la descomposición de un precursor que contiene átomos de carbono en presencia de un catalizador metálico	Se obtienen nanotubos de pared múltiple de diferentes diámetros y tamaños con pocos defectos estructurales.
Pirólisis de hidrocarburos	Económico y rápido. Se produce la descomposición de un precursor que contiene átomos de carbono en presencia de un catalizador metálico debido a altas temperaturas (600-1500°C).	Se obtienen nanotubos de pared múltiple de diferentes diámetros y tamaños con algunos defectos estructurales.
Microondas	Rápido y simple. Se produce la descomposición de un precursor metálico debido al calentamiento selectivo, uniforme y volumétrico producido por la energía suministrada por un campo Electromagnético.	Se producen nanotubos de carbono con diámetros de 50 a 100 nm con algunos defectos superficiales.

49

50 2.1.2 Optimización del proceso de síntesis de nanotubos de carbono

51 Los nanotubos de carbono (NTC) son uno de los descubrimientos más
 52 impresionantes en la nanotecnología ya que poseen propiedades superiores con
 53 respecto a otros materiales en un gran número de aplicaciones (45).

Desde el descubrimiento de los nanotubos de carbono, una variedad de técnicas para su producción se han desarrollado, donde numerosos parámetros clave y condiciones de operación tienen que ser manipulados para producir nanotubos de carbono con las propiedades finales deseadas (44). Entre estas técnicas se enumeran la descarga de arco eléctrico, la ablación por láser y la descomposición química de vapor (CVD), donde las diferentes estructuras de nanotubos de carbono se pueden producir en forma de vapor crecido, fibras de carbono y diferentes tipos de materiales nanoestructurados de carbono (46, 47).

Mubarak et al. (2014) realizaron diferentes investigaciones experimentales, en las cuales no se optimizaron las interacciones simultáneas entre las variables manipuladas para la obtención de las propiedades deseadas, y los objetivos específicos tales como la producción de nanotubos de carbono con el mínimo costo, el mínimo impacto medioambiental y mínimo riesgo no han sido considerados (48). En este contexto, en este trabajo de investigación se presenta una formulación de optimización para la síntesis de nanofibras con el mínimo costo, optimización que fue recientemente publicada (49) y donde se pone en evidencia la importancia de tomar en cuenta estos tipos de funciones objetivo.

Por otra parte, la seguridad en los procesos químicos es otro factor muy importante que pocas veces se tiene en cuenta como parámetro clave para proponer nuevas estrategias para la obtención de nuevos materiales (50). Por lo tanto, con el fin de dar cuenta de una metodología adecuada para la identificación de la síntesis y las condiciones de funcionamiento óptimas para la obtención de nanotubos de carbono con propiedades deseadas, se propone una formulación de optimización basado en correlaciones experimentales para determinar el método óptimo de síntesis y las condiciones de funcionamiento para la producción de nanotubos de carbono que representa, el mínimo costo y la máxima seguridad durante el proceso.

La formulación de optimización se basa en una formulación de programación matemática que tiene en cuenta varias variables y objetivos como se muestra en la Figura 8.

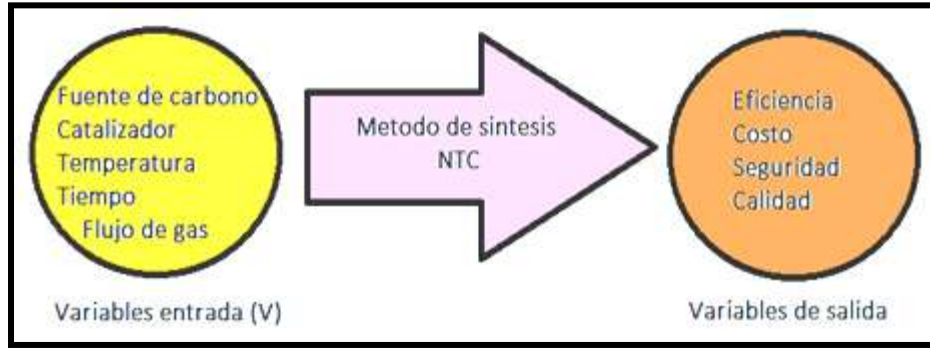


Figura 8 Interrelaciones de las variables manipuladas para la síntesis de NTC con las propiedades deseadas.

2.1.3 Propuesta del modelo matemático

Las formulaciones de programación disyuntiva permiten representar fácilmente un problema combinatorio complejo y estas formulaciones se han probado en varias aplicaciones de ingeniería (50). De esta manera se propone una formulación de programación disyuntiva para seleccionar el tipo de método de síntesis utilizado (t), así como los parámetros de funcionamiento (V), incluyendo el peso de la fuente de carbono, el peso del catalizador, la temperatura, el tiempo y la velocidad de flujo del gas portador para la síntesis de nanotubos de carbono que determinan la eficiencia (Eff), el costo de producción ($cost$), la seguridad del proceso (Saf) y la calidad de los productos obtenidos ($Qualy$). La formulación disyuntiva propuesta se indica de la siguiente manera:

$$\forall_t \left[\begin{array}{l} Y_t \\ Eff = f_t^{Eff} (V_U) \\ Cost = f_p^{cost} (V_U) \\ Saf = f_t^{Saf} (V_U) \\ Qual = f_t^{Qual} (V_U) \\ V_{U,t}^{min} \leq V_U \leq V_{U,t}^{max} \quad \forall_U \in U \end{array} \right]$$

En esta formulación, Y_p es una variable booleana que es verdadera cuando se selecciona el método de síntesis t como el óptimo, y para este caso se aplican las relaciones correspondientes para la eficiencia, el costo, seguridad y la calidad del material obtenido. Cuando la variable booleana es falsa, no se consideran las

relaciones. Debe tenerse en cuenta que para cada método de síntesis existen relaciones específicas para la eficiencia, el costo, la seguridad y la calidad, así como los límites para las variables involucradas. Además, sólo un método de síntesis debe ser seleccionado como óptimo (es decir, sólo una variable binaria debe ser igual uno):

$$\sum_T y_t = 1 \quad (28)$$

2.1.4 Caso de estudio

En este caso se evaluaron tres métodos de síntesis de NTC (descarga de arco, ablación láser y deposición química en fase vapor (CVD)), debido a que estas técnicas son las más utilizadas hoy en día para la obtención de estos nanomateriales (53). Para cada método se obtuvo una correlación entre el costo y la eficiencia como función de 5 variables específicas enlistadas en la Tabla 2; el peso inicial de fuente de carbono (gr), el peso del catalizador(gr), la temperatura (°C), el flujo de gas (ml / min) y el tiempo (min) utilizando Statgraphics. Posteriormente dichas correlaciones fueron programadas en el software GAMS.

Tabla 2 Variables para la síntesis de nanotubos de carbono presentados en el caso de estudio.

Variable Independiente	Parámetro del proceso
v_1	Peso de la Fuente de carbono, gr
v_2	Peso del catalizador, gr
v_3	Temperatura, °C
v_4	Flujo de gas, mL/min
v_5	Tiempo, min

La Tabla 3 muestra la fuente de carbono, el peso del catalizador y el flujo de gas para cada tecnología analizada en el caso de estudio. Se puede observar que para el método CVD se utilizaron dos fuentes de carbono el alcanfor y el aguarrás como caso de estudio.

Tabla 3 Fuente de carbono, peso del catalizador y flujo de gas para cada método de síntesis del caso de estudio.

Método síntesis	Fuente de carbono, gr	Catalizador, gr	Flujo gas mL/min
Descarga de arco	3.75	2.755	200
Ablación láser	0.67	0.001	400
CVD alcanfor	0.10	0.035	40.0
CVD aguarrás	4.00	0.107	10.0

El modelo presentado también tiene en cuenta el análisis de la seguridad de los diferentes métodos de síntesis para la producción de nanotubos de carbono, esta se determinó considerando la toxicidad causada por la exposición a sustancias químicas nocivas durante cada proceso. La calidad del material obtenido se considera como el deseado para todos los métodos de síntesis estudiados.

En la Tabla 4 se muestran las correlaciones para la eficiencia de cada método de síntesis estudiado considerando el peso de la fuente de carbono, el peso del catalizador, la temperatura, el flujo de gas y el tiempo.

Tabla 4 Correlaciones para el costo y eficiencia para cada método de síntesis.

Método síntesis	Correlación para la eficiencia
Descarga de arco	$Eff = -20.5048 + 45.3291 \cdot V_2 + 0.0258 \cdot V_3 + 0.0553 \cdot V_4 + 0.2602 \cdot V_5 - 0.8614 \cdot V_1 \cdot V_2 - 0.0154 \cdot V_2 \cdot V_4$
Ablación láser	$Eff = 32.16 + 856.77 \cdot V_1 + 71369.4 \cdot V_2 - 216.889 \cdot V_2 \cdot V_4 - 40.2681 \cdot V_2 \cdot V_3 - 5.5714 \cdot V_1 \cdot V_5$
CVD alcanfor	$Eff = -63.9175 - 3.03707 \cdot V_1 + 50439.6 \cdot V_2^3 + 23303.8 \cdot V_2^2 + 3056.96 \cdot V_2 + 0.0572793 \cdot V_3 + 0.513682 \cdot V_4 - 2.32872 \cdot V_5$
CVD aguarrás	$Eff = 116.273 - 61.6575 \cdot V_1 + 1665.57 \cdot V_2 + 0.053 \cdot V_3 - 1.102 \cdot V_4 + 4.66 \cdot V_5$

De igual forma, en la Tabla 5 se muestran las correlaciones para los costos de cada método de síntesis estudiado considerando el peso de la fuente de carbono, el peso del catalizador, la temperatura, el flujo de gas y el tiempo.

Tabla 5 Correlaciones para el costo y eficiencia para cada método de síntesis.

Método síntesis	Correlación para el costo
Descarga de arco	$TotCost = 0.0042 \cdot V_1 + 1.106 \cdot V_2 + 0.032 \cdot V_4 + 0.002 \cdot V_5$
Ablación láser	$TotCost = 0.0042 \cdot V_1 + 0.810 \cdot V_2 + 0.032 \cdot V_4 + 0.003 \cdot V_5$
CVD alcanfor	$TotCost = 0.023 \cdot V_1 + 0.273 \cdot V_2 + 0.032 \cdot V_4 + 0.0015 \cdot V_5$
CVD agarrás	$TotCost = 0.003 \cdot V_1 + 0.273 \cdot V_2 + 0.032 \cdot V_4 + 0.0015 \cdot V_5$

El análisis de la seguridad en el proceso de síntesis de nanotubos de carbono se determina por las ecuaciones (2) - (5), donde la seguridad para cada tecnología es una función de las variables del proceso definido en la optimización del proceso de síntesis.

$$Saf = f_t^{Saf} (V_U) \quad (29)$$

$$R^{fuentedecarbono} = f(m_{fuentedecarbono}) \frac{0.5}{LD_{50}^{CS} M} \quad (30)$$

$$R^{Catalizad\phi} = f(m_{Catalizad\phi}) \frac{0.5}{LD_{50}^C M} \quad (31)$$

$$R^{Gas} = f(m_{gas}) \frac{0.5}{LD_{50}^{GI} M} \quad (32)$$

Los valores de la dosis letal media, LD_{50} , se obtuvieron de la base de datos del software SCRI (54) y el peso promedio de un adulto considerado (M) fue 70 kg.

La Tabla 6 muestra la correlación de la fuente de carbono y peso del catalizador como función de los parámetros del proceso para cada método de síntesis.

Tabla 6 Correlaciones de toxicidad para cada método de síntesis.

Método síntesis	Fuente de carbono	Catalizador
Descarga de arco	$V_1 = 10.9 + 7.7 \cdot V_2 - 0.008 \cdot V_3 - 0.0015 \cdot V_4 + 0.103 \cdot V_5$	$V_2 = -1.42 + 0.115 \cdot V_1 + 0.0099 \cdot V_3 + 0.00089 \cdot V_4 - 0.0082 \cdot V_5$
Ablación láser	$V_1 = 0.32 + 5.06 \cdot V_2 + 0.002 \cdot V_3 - 0.032 \cdot V_4 + 0.24 \cdot V_5$	$V_2 = -0.304 + 0.027 \cdot V_1 + 0.00027 \cdot V_3 + 0.00055 \cdot V_4 + 0.0024 \cdot V_5$
CVD alcanfor	$V_1 = 4.42 - 2.351 \cdot V_2 + 0.0029 \cdot V_3 - 0.123 \cdot V_4 + 0.086 \cdot V_5$	$V_2 = 0.237 - 0.03 \cdot V_1 + 0.00032 \cdot V_3 - 0.0081 \cdot V_4 + 0.005 \cdot V_5$
CVD aguarrás	$V_1 = -2.005 + 0.19 \cdot V_2 - 0.000055 \cdot V_3 + 0.04 \cdot V_4 + 0.29 \cdot V_5$	$V_2 = -0.239 + 0.0025 \cdot V_1 + 0.00028 \cdot V_3 + 0.0015 \cdot V_4 + 0.0094 \cdot V_5$

2.1.5 Resultados y Discusión.

Las correlaciones obtenidas en Statgraphics y las ecuaciones para determinar el costo se codificaron en el software GAMS (55). Los resultados se muestran en la Figura 9, a partir de estos resultados se observa que la mejor solución económica implica el uso de CVD utilizando aguarrás como fuente de carbono; por otro lado, se tiene que el uso de alcanfor como fuente de carbono en CVD proporciona una solución con un costo moderado, pero con la eficiencia mínima.

La descarga de arco y la ablación láser producen el peor escenario económico con una eficacia moderada. Para el método de descarga de arco el costo por gramo de nanotubos de carbono aumenta de cero con una eficiencia de 0% hasta 18.645 dólares con ~ 100% de eficiencia. Con respecto al método de ablación láser, el aumento de los costos va de cero con un 0% de eficiencia hasta 14.438 dólares con ~ 100% de eficiencia. Mientras que para el método de deposición química de vapor, el costo aumenta desde cero a 3,419 dólares hasta ~ 100% de eficiencia cuando se utiliza alcanfor como fuente de carbono, y aumenta de cero a 0,374 dólares en ~ 100% de eficiencia cuando se utiliza aguarrás como fuente de carbono.

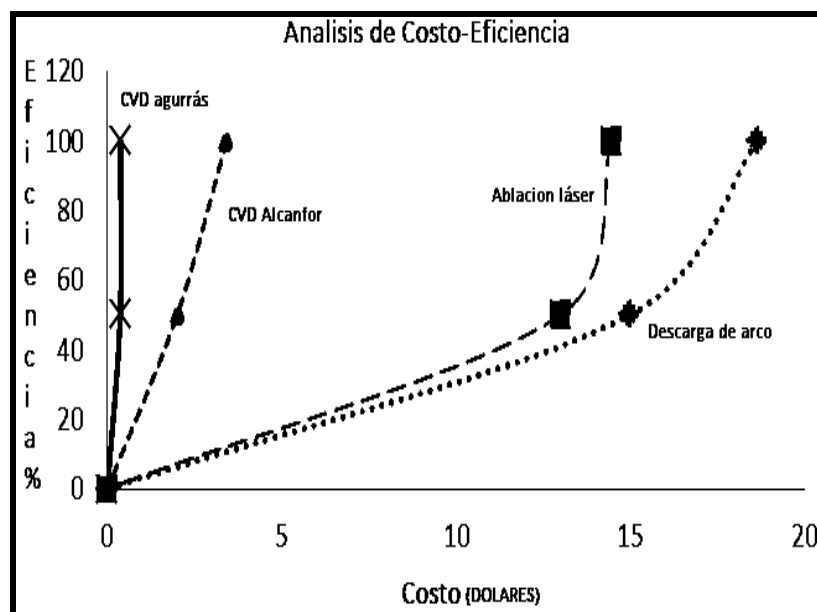


Figura 9 Resultados para costo y eficiencia para cada método de síntesis estudiado.

Los resultados de toxicidad para las diferentes soluciones óptimas se muestran gráficamente en la Figura 10. Se observa que el daño a la salud causado por exposición a la fuente de carbono por el método de descarga de arco es demasiado pequeño, mientras que debido a los daños ocasionados asociado al catalizador es de 0,002% de las muertes por la exposición a 0.050 g durante 5 minutos. Para el método de ablación con láser, el catalizador utilizado representa un 0.225% de las muertes causadas por la exposición a 0.001 g durante 1 minuto. Respecto al método CVD, utilizar alcanfor como fuente de carbono, representa un 0.001656% de fatalidad causada por la exposición a 0,004 g de catalizador durante 12 minutos, y un 0,01945% muertes por la exposición a 0,100 g de fuente de carbono durante 12 minutos. Por último, para el método de CVD usando agurrás como fuente de carbono, se obtiene un 0,00088% de muertes por exposición a 0,1 g de catalizador durante 8 minutos y un 0,000006% de muertes por exposición a 4 g de fuente de carbono durante 8 minutos.

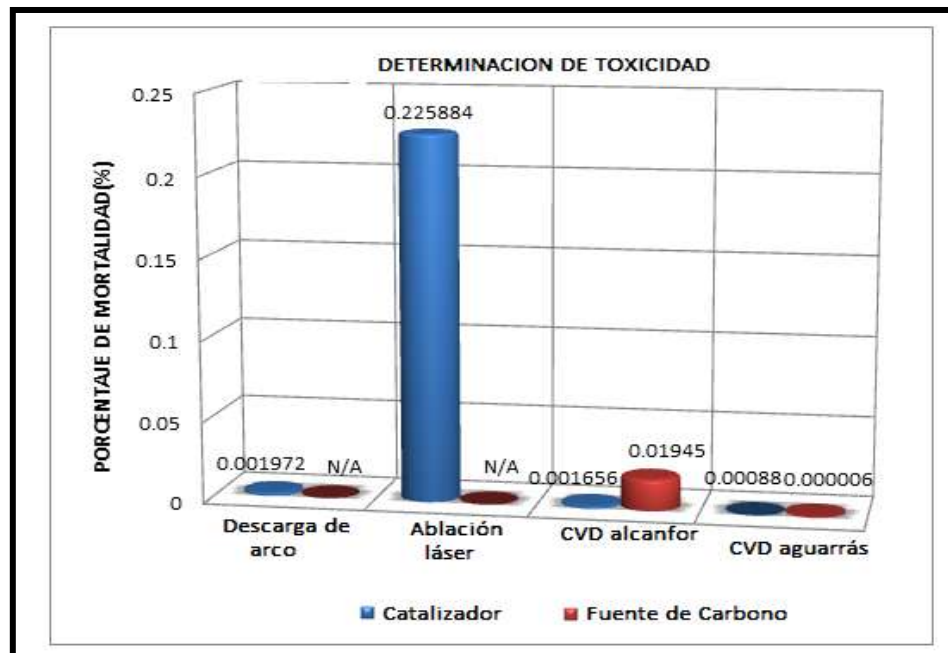


Figura 10 Toxicidad implícita en cada método de síntesis estudiado.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que el método CVD es el más limpio, más eficiente y más seguro con respecto a los otros dos métodos analizados, descarga de arco y ablación láser. Esta cuestión pudo ser determinada y analizada mediante el desarrollo de correlaciones y su respectiva programación, lo cual demuestra la importancia y la relevancia de realizar estos análisis antes del desarrollo experimental.

2.2 Optimización matemática de la síntesis de nanofibras poliméricas

2.2.1 Las Nanofibras poliméricas

En la literatura científica se define como nanofibra aquellas fibras con diámetros menores a los 100 nanómetros. Sin embargo el sector comercial es más flexible en este aspecto aceptando como nanofibras aquellas con diámetros hasta de 300 a 600 nm (42; 56).

Las nanofibras han encontrado su nicho en el nuevo mundo de la nanotecnología. Un punto en contra de esta nueva tecnología es su dificultad de

síntesis, dado que se requieren generalmente de procedimientos químicos complicados para su elaboración.

En el campo de los polímeros, es posible el desarrollo de nanofibras con integridad estructural diseñadas para poseer características bioquímicas específicas, lo que podría llevar a que estas colecciones de nanofibras con química de superficie específica, puedan adherirse a células para controlar sus funciones.

Las características de estas colecciones (mallas) de nanofibras demuestran una morfología y química similar a la matriz extracelular del tejido natural, es decir, un amplio intervalo de distribución de diámetro de poros, alta porosidad, propiedades mecánicas efectivas y propiedades bioquímicas específicas. Es así que es posible aprovechar a los polímeros y biopolímeros en forma de nanofibras en aplicaciones como membranas multifuncionales y elementos estructurales biomédicos como el andamiaje utilizado en la ingeniería de tejidos, los recubrimientos para heridas, órganos artificiales, reparación vascular, etc., y además en textiles especializados y filtros para partículas sub-micra, entre muchas más aplicaciones en el campo de la biomedicina (8; 57).

2.2.2 Propiedades de las nanofibras poliméricas como nanomateriales.

Debido a que los nanomateriales pueden restaurar y sustituir funciones de tejidos vivos y órganos en el cuerpo, es esencial que éstos posean ciertas propiedades; que sean fáciles de esterilizar, manipular y que promuevan las interacciones entre los materiales biológicos y los implantados. Dichas propiedades pueden ser clasificadas en propiedades biológicas, fisicoquímicas y en propiedades mecánicas (33; 58; 59).

2.2.2.1 Propiedades biológicas

Cualquier material implantado debe ser biocompatible y biodegradable para no provocar reacciones adversas que impidan obtener el efecto deseado y por tanto es necesario tener en cuenta los factores descritos a continuación:

- Los materiales individuales deben de ser de origen biológico.
- Que el material presente un grado controlado de degradación.
- Que sea un material biocompatible y sin citotoxicidad.
- Poseer propiedades que faciliten las interacciones célula-sustrato.
- Que presente baja respuesta inmune e inflamatoria.
- Que sea de fácil producción, purificación y uso.
- Ser compatible químicamente con soluciones acuosas y condiciones fisiológicas.
- Facilitar la proliferación del tejido a reemplazar.
- Y ser estable en el área implantada.

2.2.2.2 Propiedades físico – químicas

Los materiales pueden presentar diversas alteraciones superficiales como son la corrosión, la solubilidad en algunos componentes o su desintegración en función del tiempo, la porosidad la cristalinidad, el comportamiento térmico, el comportamiento mecánico y la resistencia a la degradación química en general. De este modo el material debe poseer un apropiado grado de degradación para asegurar el mantenimiento de una estructura necesaria desde el momento de implante hasta que el nuevo tejido formado sustituya al soporte. En el caso del comportamiento térmico hay que distinguir tres temperaturas, la de fusión, la de descomposición y la de transición vítrea.

2.2.2.3 Propiedades mecánicas

Los materiales seleccionados para ser utilizados como implantes deben poseer unas propiedades mecánicas apropiadas como son la rigidez, porosidad, interconectividad y tamaño de poros adecuado, superficie específica, permeabilidad y rugosidad del sustrato. Las características de la superficie del implante deben ser: rugosidad, grado de pulido, porosidad, potencial eléctrico, humectación y comportamiento hidrofóbico o hidrófilo, son factores decisivos que afectan su compatibilidad y determinarán la interacción del implante con las células adyacentes y su capacidad de colonizar su superficie.

2.2.3 Aplicaciones biomédicas de las nanofibras poliméricas

Dentro de las principales aplicaciones biomédicas en que se han utilizado ampliamente las nanofibras poliméricas se encuentran: el saneamiento de heridas (60), como membranas de filtración (61), en la liberación de fármacos (62), la ingeniería de tejidos (27), la restauración de hueso (30), la inmovilización de enzimas (63), la industria cosmética (64), biosensores(19) , como material de refuerzo (38), entre otras (ver Figura 11).

Recientemente, K. Jalaja el al. sintetizaron nanodfibras de quitosano/gelatina mediante electrohilado coaxial, y demostraron que éstas poseen excelentes propiedades para la adhesión y la proliferación celular (65).

Alaa J Hassiba el at. presentaron una investigación donde mostraron los recientes avances de las nanofibras poliméricas en aplicaciones biomédicas, ellos concluyeron que las nanofibras poseen propiedades superiores a las de cualquier compuesto para ser utilizadas en saneamiento de heridas, y que el mejor método para obtenerlas es el electrohilado (66).

En 2015, Narendra Reddy et al. remarcaron que los biomateriales hechos a base de polímeros, proteínas y polisacáridos son los más viables y efectivos para ser utilizados en aplicaciones biomédicas, sin embargo, al carecer de propiedades mecánicas es necesario hacer un entrecruzamiento entre ellos y con otros agentes para obtener las propiedades deseadas para su uso en aplicaciones biomédicas (67).

Zhao et al. en 2015 reportaron la síntesis de nanofibras poliméricas de quitosano, ácido hialurónico, heparina y sulfato de condroitina vía electrohilado, remarcando el potencial biomédico de cada uno de estos materiales; ellos mostraron que los polisacáridos animales son excelentes candidatos para ser empleados como fuentes naturales en la síntesis de nanofibras para aplicaciones biomédicas (19).

Jaishri Sharma et al. mostraron que las nanofibras poliméricas poseen excelentes características para ser utilizadas en el tratamiento de heridas y en

303 aplicaciones terapéuticas activas (49) . Del mismo modo, Hiremath et al.
 304 mostraron que las nanofibras poliméricas son ampliamente utilizadas en diferentes
 305 aplicaciones biomédicas, mencionando las principales aplicaciones como
 306 cosmética, ingeniería de tejidos, hueso, piel, nervios, etc. (67).

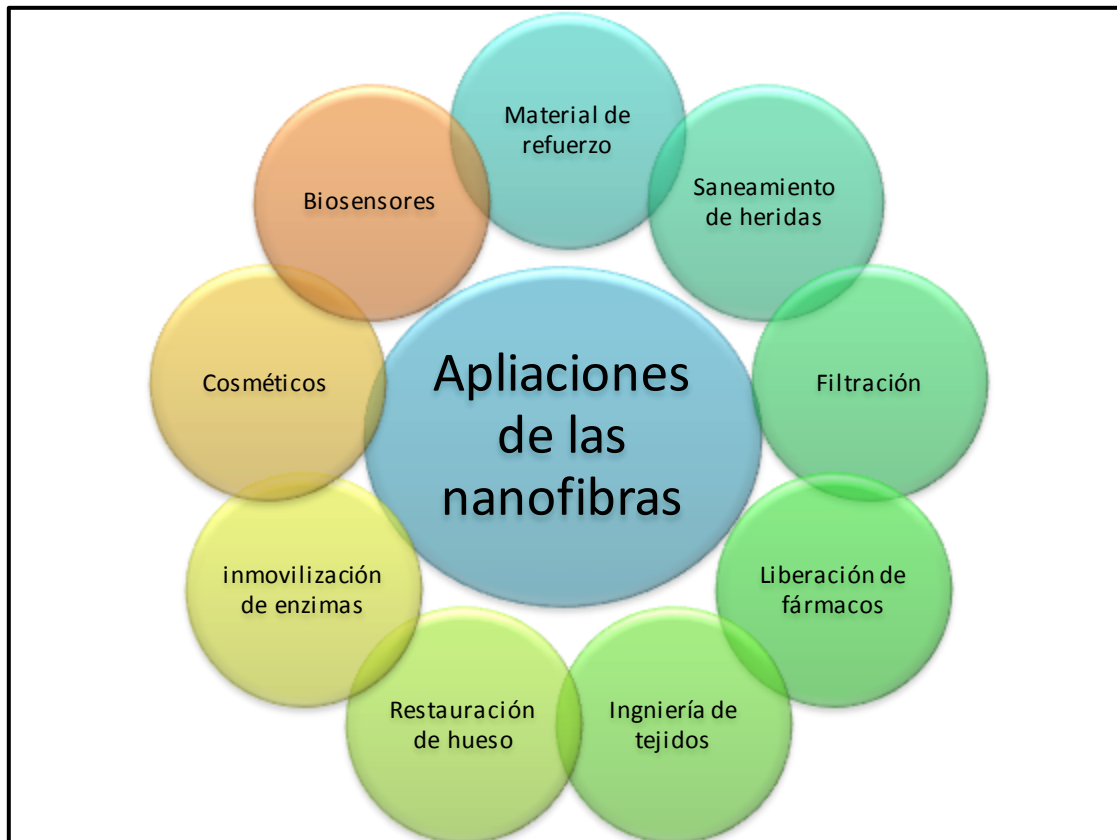


Figura 11 Aplicaciones biomédicas de las nanofibras.

2.2.4 Síntesis de Nanofibras poliméricas.

311 Las nanofibras poliméricas pueden obtenidas a partir de un número
 312 considerable de técnicas tales como son: Drawing, síntesis por molde, separación
 313 de fase, auto ensamblaje, templado, polimerización en fase vapor, extracción y
 314 electrohilado, siendo éste último método el más utilizado (2; 8; 49).

315 Upma Sharma et al. en 2013 patentaron la tecnica de electrohilado para la
 316 síntesis de nanofibras poliméricas (49).

En 2015, Tao Jiang et al. desarrollaron una investigación de las estrategias de síntesis de nanofibras por medio del electrohilado considerando todos los errores, así como el uso de nanofibras para medicina regenerativa y concluyeron que esta técnica es la más eficaz y ampliamente utilizada y que las nanofibras poseen un amplio espectro de aplicaciones en biomedicina debido a sus características y propiedades únicas (68).

2.2.5 El electrohilado

El electrohilado, comparado con otros métodos convencionales es reconocido como un proceso fácil y rápido para fabricar fibras continuas de tamaño micro y nanométrico.

La técnica de electrohilado consta de un electrodo que es conectado a la punta de una aguja que contiene una solución polimérica y otro electrodo que se conecta a un colector metálico, el cual a su vez es conectado a tierra. Cuando un alto voltaje es aplicado, la repulsión de cargas en la superficie del fluido causa una fuerza directamente opuesta a la tensión superficial del fluido. Cuando el campo eléctrico es incrementado, la superficie semiesférica del fluido en la punta de la aguja del inyector se alarga hasta llegar a la forma cónica llamado “cono de Taylor”. Un chorro de fluido cargado es expulsado desde la punta del cono de Taylor, cuando la fuerza electrostática vence la tensión superficial en un valor crítico del campo eléctrico. Una característica observada durante este proceso es la salida aleatoria del chorro polimérico conocida como “flagelación”.

La evaporación del solvente toma lugar desde las fibras poliméricas cargadas hasta el camino al colector produciendo sobre el colector una colección de fibras no tejidas (65; 69). En la Figura 12 se muestra este proceso de manera representativa.

Ali Eatemadi et al. concluyeron que el electrohilado es el método más eficaz y utilizado para la síntesis de nanomateriales en forma de nanofibras para aplicaciones biomédicas (70).

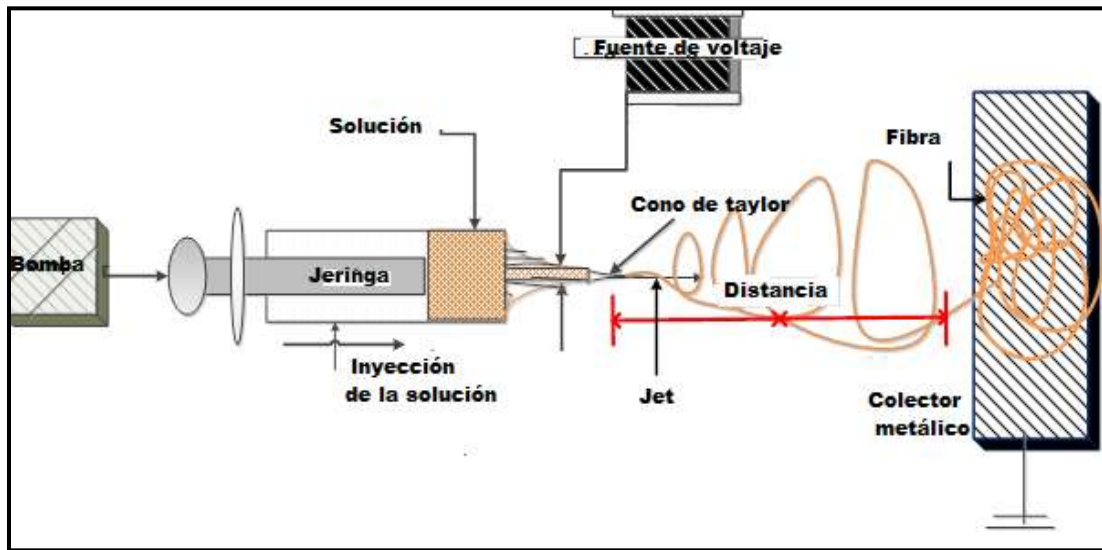


Figura 12 Esquema representativo del proceso de electrohilado para la síntesis de nanofibras.

2.2.5.1 Variables de Proceso de electrohilado

La calidad y el diámetro de las nanofibras son clave para sus aplicaciones potenciales en el área biomédica, y los parámetros que influyen para obtener nanofibras de buena calidad con el diámetro deseado son muchos (35; 74; 75), estos pueden clasificarse en:

- Parámetros de la solución: concentración, peso molecular viscosidad, tensión superficial y conductividad.
- Parámetros de proceso: voltaje, velocidad de flujo, tipo de colector y distancia entre colector y aguja.
- Parámetros ambientales: humedad y temperatura.

2.2.5.2 Parámetros de la solución.

Concentración: La formación de fibras por electrohilado es ante todo basado en la concentración y la tensión superficial de la solución polimérica. Diferentes polímeros requieren diferentes concentraciones de solución para ser electro hilado. Uno de los parámetros más importantes a controlar en el electrohilado es el diámetro de las fibras. Un problema detectado en esta técnica es la formación de defectos en las fibras tales como “gotas” y poros. Se ha

encontrado que la concentración del polímero también afecta la formación de los defectos. Existen cuatro concentraciones críticas que hay que señalar:

1. Cuando la concentración es muy baja, se obtienen nanopartículas poliméricas. En este momento, se produce el fenómeno denominado electrospray en lugar del electrohilado debido a la alta viscosidad y la baja tensión superficial de la solución.

2. A medida que la concentración es poco más alta, se obtiene una mezcla de granos y fibras.

3. Cuando la concentración es adecuada, se obtienen nanofibras lisas y alineadas.

4. Si la concentración es muy alta se obtienen fibras en forma de hélices.

Por lo general, al aumentar la concentración de la solución, el diámetro de la fibra aumenta si la concentración de solución es adecuada para el electrohilado.

Peso Molecular del polímero: El peso molecular del polímero también tiene un efecto importante en la morfología de las fibras. En principio, el peso molecular refleja el acomodo de las cadenas del polímero en la solución. Mantener la concentración fija, disminuyendo el peso molecular de las tendencias de polímero puede llegar a formar perlas en lugar de fibras lisas. Y si se aumenta demasiado el peso molecular se obtendrá un micro cinta.

Viscosidad: Este parámetro es la clave fundamental en la determinación de la morfología de la fibra. Se ha demostrado que no se pueden obtener fibras continuas y lisas con una muy baja viscosidad, mientras que a viscosidades altas resulta muy difícil inyectar la solución y formar el jet.

Es importante señalar que la viscosidad, la concentración de polímero, y peso molecular polimérico están relacionados entre sí.

Tensión superficial: La tensión superficial, como función de las composiciones del disolvente de la solución, es un factor muy importante en el

electrohilado. Con una concentración fija, la reducción de la tensión superficial de la solución puede dar lugar a la formación de fibras lisas. Básicamente, la tensión superficial determina los límites superior e inferior de la ventana de electrohilado si se fijan todas las demás condiciones.

Conductividad: Los iones cargados en la solución polimérica influyen considerablemente en la formación de fibras. Cuando las cargas en la solución polimérica se incrementan el campo eléctrico genera mayor fuerza de elongación sobre el cono de Taylor dando como resultado fibras con diámetros más finos y una notable disminución de los defectos.

2.2.5.3 Parámetros del proceso.

Voltaje: En el proceso de electrohilado, un elemento fundamental es el voltaje aplicado a la solución; pues sólo después de alcanzar el voltaje correcto, ocurre la formación de las fibras, esto es debido a la afinidad de la solución con el campo eléctrico y de esta manera inicia el proceso de electrohilado. Se ha demostrado que al aplicar altas tensiones eléctricas, hay más eyección de polímero y esto a su vez facilita la formación de una fibra de menor diámetro. También se debe tener en cuenta que un aumento mayor en el voltaje aplicado puede llevar a la formación de perlas (13; 71).

Velocidad de inyección: La velocidad de flujo de salida del polímero de la jeringa es un parámetro importante en el proceso, ya que influye en la velocidad del jet como en su reacción y tasa de transferencia del material. Una menor velocidad de flujo es más deseable ya que el disolvente tendrá un tiempo suficiente para la evaporación. Siempre debe haber un caudal mínimo en la solución de hilado, una alta velocidad de flujo da como resultado que las fibras no cuenten con el tiempo necesario para su secado o evaporación del disolvente antes de llegar al colector.

Tipos de colectores: Un aspecto importante del proceso de electrohilado es el tipo de colector utilizado. En este proceso, un colector sirve como un conductor substrato, donde las nanofibras se recogen. Generalmente, una lámina

de aluminio se utiliza como un colector, pero debido a la dificultad en la transferencia de fibras recogidas y con la necesidad de fibras alineadas para diversas aplicaciones; se han utilizado otros colectores, tales como: papel conductor, tela conductora, malla de alambre, pasadores, barras paralelas o cuadriculadas, varillas de rotación y ruedas giratorias. En el electrohilado la alineación de la fibra se determina por el tipo de metal, el colector y su velocidad de rotación (72).

Distancia del colector-aguja: La distancia entre la punta de la aguja y el colector ha sido determinada como otro parámetro para controlar los diámetros de las fibras y su morfología. Además que se requiere una distancia mínima para dar a las fibras el tiempo suficiente para secarse antes de llegar al colector de lo contrario con las distancias que son muy cercanas o muy lejanas, se han observado la presencia de impurezas y aglomerados en la fibra.

2.2.5.4 Parámetros ambientales

Temperatura vs viscosidad: se han hecho investigaciones las cuales muestran el efecto de la temperatura sobre el proceso de electrohilado; determinando que con el aumento en la temperatura, hay un rendimiento de las fibras acorde con la disminución del diámetro de las mismas; es decir la disminución del diámetro de las fibras está asociada a la disminución de la viscosidad de las soluciones del polímero al aumentar la temperatura (73).

Humedad: Existe una relación inversa entre la viscosidad y la temperatura, encontrando que en una muy baja humedad, un disolvente volátil se puede secar rápidamente por la evaporación del disolvente. A veces la tasa de evaporación es tan rápida que en comparación con la evaporación del disolvente desde la punta de la aguja da como resultado, que el proceso de electrohilado sólo puede llevarse a cabo por unos pocos minutos antes de la punta de la aguja sea obstruida (50).

2.2.6 Optimización de la síntesis de nanofibras por medio del electrohilado

En reportes anteriores la programación matemática en procesos químicos ha sido ampliamente utilizada en la optimización de procesos (29). Esto tiene la ventaja de que permite manipular una gran cantidad de variables y restricciones para determinar la solución óptima de un problema dado.

En particular, las formulaciones de programación disyuntiva permiten representar fácilmente un problema combinatorial complejo y estas formulaciones se han probado en varias aplicaciones de ingeniería ((56; 69).

Con lo que respecta a la programación matemática del electrohilado, existen pocas publicaciones y ninguna de ellas involucra análisis de costos y seguridad del proceso de síntesis, las cuales son de suma importancia pues se evitan gastos y riesgos innecesarios y al mismo tiempo se determinan las características de la fibra que se desea obtener.

De esta manera, en este trabajo de investigación publicado recientemente (29), se propone una formulación de programación disyuntiva general para determinar el costo mínimo asociado a la producción de nanofibras con características específicas. Esta formulación disyuntiva debe seleccionar el tipo de polímero utilizado (p), el valor de las variables (V) en las que se incluye la concentración, el voltaje, la distancia entre los electrodos, la velocidad de inyección y la temperatura, para determinar el diámetro de las nanofibras requerido y satisfactorio ($Diam$) especificando limitaciones para las variables manipuladas (V). Esta formulación incluye las relaciones de cada polímero para el costo ($f_p^{cost}(V_U)$) y el diámetro ($f_p^{Diam}(V_U)$) como una función de las variables manipuladas (V). La formulación disyuntiva propuesta se indica a continuación.

$$\bigvee_p \left[\begin{array}{c} Y_p \\ Cost = f_p^{Cost}(V_U) \\ Diam = f_p^{Diam}(V_U) \\ V_{U,p}^{\min} \leq V_U \leq V_{U,p}^{\max} \quad \forall U \in U \end{array} \right]$$

En esta formulación, Y_p es una variable booleana que es verdadera cuando se selecciona el polímero p como el óptimo, y para este caso se aplican las relaciones correspondientes para el costo y el diámetro. Cuando la variable booleana es falsa, no se consideran las relaciones. Debe tenerse en cuenta que para cada polímero existen relaciones específicas para el diámetro y el costo, así como los límites para las variables involucradas. Además, sólo un polímero debe ser seleccionado como óptimo. La formulación disyuntiva anterior debe ser reformulada como un conjunto de relaciones algebraicas que se ejecutarán como programación matemática formal. En primer lugar las variables booleanas (Y_p) se transforman en variables binarias (y_p); cuando la variable booleana es verdadera la variable binaria correspondiente es 1, y cuando la variable booleana es falsa la variable binaria correspondiente es cero. Entonces, la reformulación se indica de la siguiente manera: sólo un polímero debe ser seleccionado (es decir, sólo una variable binaria debe ser igual uno):

$$\sum_p Y_p = 1 \quad (1)$$

Entonces, en las relaciones para determinar el costo ($Cost$) y el diámetro de nanofibras deben indicarse sólo para el polímero p seleccionado para ser el óptimo de la siguiente manera:

$$Cost \leq f_p^{Cost}(V_U) + M^{Cost}(1 - y_p), \quad \forall_p \in p \quad (2)$$

$$Cost \geq f_p^{Cost}(V_U) + M^{Cost}(1 - y_p), \quad \forall_p \in p \quad (3)$$

$$Diam \leq f_p^{Diam}(V_U) + M^{Diam}(1 - y_p), \quad \forall_p \in p \quad (4)$$

$$Diam \geq f_p^{Diam}(V_U) + M^{Diam}(1 - y_p), \quad \forall p \in P \quad (5)$$

492

493 Donde M^{Cost} es un parámetro que se utiliza para activar el costo
 494 correspondiente. De esta manera, cuando se selecciona el polímero p , a
 495 continuación, la variable binaria es uno y el último término de las relaciones (2) y
 496 (3) es cero.

497 Este modelo es general, y puede ser utilizado para cualquier cantidad de
 498 polímeros y considerando diferentes variables, sólo se requieren las relaciones
 499 para determinar el costo y el diámetro a partir de datos experimentales. El modelo
 500 fue codificado en el software GAMS) (55) y la siguiente sección presenta un caso
 501 estudio para validar el uso del modelo.

502 2.2.7 Caso de estudio.

503 En este caso se consideraron tres polímeros (colágeno, gelatina y
 504 quitosano) y se evaluaron las relaciones que existen entre el diámetro. Estos
 505 polímeros fueron seleccionados debido a que sus aplicaciones biomédicas han
 506 aumentado dado sus excelentes características de biocompatibilidad y
 507 biodegradabilidad (13; 19; 22; 66).

508 Una forma de representar la relación entre el diámetro de nanofibras y los
 509 parámetros de electrohilado se representa por la ecuación (6):

$$Diam = f_p^{Diam}(v_1, v_2, v_3, v_4, v_5) \quad (6)$$

510 Donde $Diam$ es el diámetro promedio (nm), v_1, v_2, v_3, v_4 y v_5 son las
 511 variables de optimización U considerados en este caso y se describen en la Tabla
 512 7.

513

514

515

Tabla 7 Variables de optimización de electrohilado en el caso de estudio.

Variable independiente	Parámetro del electrospinning
v_1	Concentración de la solución(%w/v)
v_2	Voltaje aplicado (kV)
v_3	Distancia (cm)
v_4	Velocidad de alimentación (ml/h)
v_5	Temperatura (°C)

Para representar la optimización del método y la influencia de los parámetros de síntesis se hizo uso de datos experimentales reportados de trabajos anteriores para la síntesis de nanofibras de colágeno, gelatina y quitosano (19; 22; 48; 70), se realizó una regresión para establecer una relación cuantitativa entre el diámetro de la fibra y los parámetros de procesamiento de electrohilado para cada polímero, utilizando el software Statgraphics. Por análisis de regresión múltiple se encontró una ecuación polinomial, que muestra una relación entre la variable dependiente (diámetro) y las variables independientes: la concentración inicial de polímero (%w/v), voltaje (kV), distancia entre la punta de la aguja al colector (cm), velocidad de alimentación de flujo (ml/h) y la temperatura (°C). Esta ecuación polinomial se introduce en el modelo matemático para representar la dependencia del diámetro de la fibra frente a los parámetros de electrohilado.

Las relaciones para el diámetro se representan para el colágeno en la Ecuación 7, para gelatina en la Ecuación 8 y para quitosano en la Ecuación 9, con coeficientes de correlación (R^2) entre los valores experimentales y calculados obtenidos a partir de la ecuación de superficie de respuesta de 0.975, 0.898 y 1.00 respectivamente.

$$Diam = -3736.98 + 12.65v_1^3 - 173.84v_1^2 + 694.29v_1 + 143.202v_2 - 16.21v_3^2 + 286.731v_3 - 497.904v_4 - 0.01v_1^3v_2^2 + 2.23v_3^2v_4 + v_1^2v_5 \quad (7)$$

$$Diam = -7647.83 + 0.07v_1^3 - 3.35v_1^2 + 46.19v_1 - 3.66v_2^2 + 153.0v_2 - 47.07v_3^2 + 1048.3v_3 - 465.71v_4^3 + 1203.88v_4^2 + v_1v_4^2 + v_1v_5 \quad (8)$$

$$Diam = 1089.67 - 0.45v_1^2 + 32.26v_1 - 0.94v_2^2 + 31.29v_2 + 4.19v_3^2 - 180.26v_3 - 180.89v_4^2 + 478.72v_4 + v_1v_5 \quad (9)$$

Para calcular el costo de un miligramo de nanofibras producidos por el proceso de electrohilado, se consideró la siguiente ecuación:

$$TotCost = Cost^{polymer} + Cost^{solvent} + Cost^{electricity} \quad (10)$$

Donde $TotCost$ es el costo total de producción de un miligramo de nanofibras, $Cost^{polymer}$ es el costo asociado con el polímero utilizado en la producción de un miligramo de nanofibras, $Cost^{solvent}$ es el costo del disolvente utilizado y $Cost^{electricity}$ es el costo asociado a la electricidad consumida para la producción de un miligramo de nanofibras con las características específicas indicadas.

Para determinar el costo para el polímero utilizado (Costo de polímero), la ecuación (11) se aplica:

$$Cost^{polimero} = UC^{polimero} * m^{polimero} \quad (11)$$

Donde $m^{polimero}$ es la masa de polímero requerido para producir un miligramo de nanofibras electrohiladas y $UC^{polimero}$ es el costo unitario para el polímero.

Para calcular el costo de disolvente utilizado, se utiliza la ecuación (12):

$$Cost^{solvente} = UC^{solvente} * V^{solucion} \quad (12)$$

Donde, la $V^{solucion}$ es el volumen total utilizado en mililitros y $UC^{solvente}$ es el costo por mililitro de disolvente utilizado en la síntesis de un miligramo de nanofibras.

La Tabla 8 muestra los costos unitarios en dólares asociados a los polímeros considerados y su correspondiente disolvente.

Tabla 8 Costos unitarios de los polímeros y solventes utilizados.

Polímero	Solvente	Costo Polímero /mg	Costo solvente/mL
Colágeno	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP)	\$ 50.31/mg	\$ 5.29/mL
Gelatina	Ácido acético	\$ 0.0012/mg	\$ 0.1091/mL
Quitano	Ácido trifluoro-acético	\$ 0.0018/mg	\$0.3580/mL

La electricidad consumida durante la producción de nanofibras representa un costo, que se calcula utilizando la ecuación (13) y considera los gastos de electricidad de la disolución, de la bomba inyección y del electrohilado.

$$Cost^{electricidad} = Cost_{bomba}^{electricidad} + Cost_{electrospinning}^{electricidad} + Cost_{voltage}^{electricidad} \quad (13)$$

Por lo tanto, en este caso el costo total de electricidad de electrohilado se calcula como de la siguiente manera:

$$Cost_{electrospinning}^{electricidad} = UEC P_{bomba} t + UEC P_{electrospinning} + UEC 24v_2 t \quad (14)$$

Donde P_{bomba} es la potencia de la bomba, $P_{electrospinning}$ es la potencia del electrohilado, $24v_2$ es la potencia por kV aplicado a la solución polimérica, t es el tiempo de proceso de electrohilado y UEC es el costo de electricidad por kilovatio-hora.

La Tabla 9 muestra los costos de la energía y de la electricidad para la unidad de la bomba, el electrohilado y el voltaje aplicado.

Tabla 9 Potencia y electricidad de los equipos involucrados en el electrohilado.

Equipos	Potencia	Costo de electricidad
Bomba	0.040 kW	\$ 0.06/kW-h
Electrospinning	5.30 kW	\$ 0.06/kW-h
Voltaje	$24v_2$	\$ 0.06/kW-h

Puede observarse que t es el tiempo en el que se inyectó la solución polimérica total, este se calcula como sigue:

$$t = \frac{V_{solucion}}{v_4} \quad (15)$$

573 Donde, V es el volumen total de la solución polimérica y esto se calcula con
574 la siguiente relación:

$$V_{solucion} = \frac{100m^{polimero}}{v_1} \quad (16)$$

575 Y combinando las ecuaciones (15) y (16):

$$t = \frac{100m^{polymer}}{v_1 v_4} \quad (17)$$

576 Entonces, con la sustitución de los valores unitarios indicados en la Tabla 3
577 y la combinación de las ecuaciones anteriores, se obtiene la siguiente expresión
578 para el costo de la electricidad asociada con el proceso de electrohilado para
579 producir un miligramo de nanofibras:

$$Cost^{electricity} = 0.040UEC \frac{100}{v_1 v_4} + 5.30UEC \frac{100}{v_1 v_4} + 24UEC \frac{100v_2}{v_1 v_4} \quad (18)$$

580 El costo total de producción por miligramo de nanofibras se calcula como
581 sigue:

$$TotCost = m^{polimero} + 100 \frac{V_{solucion}}{v_1} + 0.040 \frac{100}{v_1 v_4} + 5.30 \frac{100}{v_1 v_4} + 24 \frac{100v_2}{v_1 v_4} \quad (19)$$

582

583 Sustituyendo los valores para cada polímero se obtienen las expresiones
584 (20) para colágeno, (21) para gelatina y (22) para quitosano.

$$TotCost = 50.31 + \frac{529.23}{v_1} + \frac{32.24}{v_1 v_4} + \frac{144v_2}{v_1 v_4} \quad (20)$$

$$TotCost = 0.0012 + \frac{10.91}{v_1} + \frac{32.24}{v_1 v_4} + \frac{144v_2}{v_1 v_4} \quad (21)$$

$$TotCost = 0.0018 + \frac{35.80}{v_1} + \frac{32.24}{v_1 v_4} + \frac{144v_2}{v_1 v_4} \quad (22)$$

2.2.8 Resultados y Discusión.

En la primera parte se presenta un análisis de las interacciones entre las variables involucradas en la producción de nanofibras utilizando el proceso de electrohilado y después se discuten los resultados de optimización del proceso de síntesis.

a) Nanofibras de colágeno

La Figura 13 muestra la influencia de los parámetros de electrohilado de nanofibras de colágeno. Para éste polímero, el parámetro más importante que afecta el diámetro es la concentración. Se puede observar en las Figuras 13a y 13c que el aumento de la concentración y el voltaje aplicado produce un menor tamaño en el diámetro de las nanofibras. Considerando que, cuando la distancia disminuye y la velocidad de inyección aumenta los diámetros aumentan. De igual forma en las Figuras 13b y 13d se observa que aumentan los diámetros de las nanofibras cuando disminuye la distancia. Los diámetros más pequeños se obtienen con una distancia más grande, concentraciones más bajas y un mayor voltaje aplicado (Figura 13e).

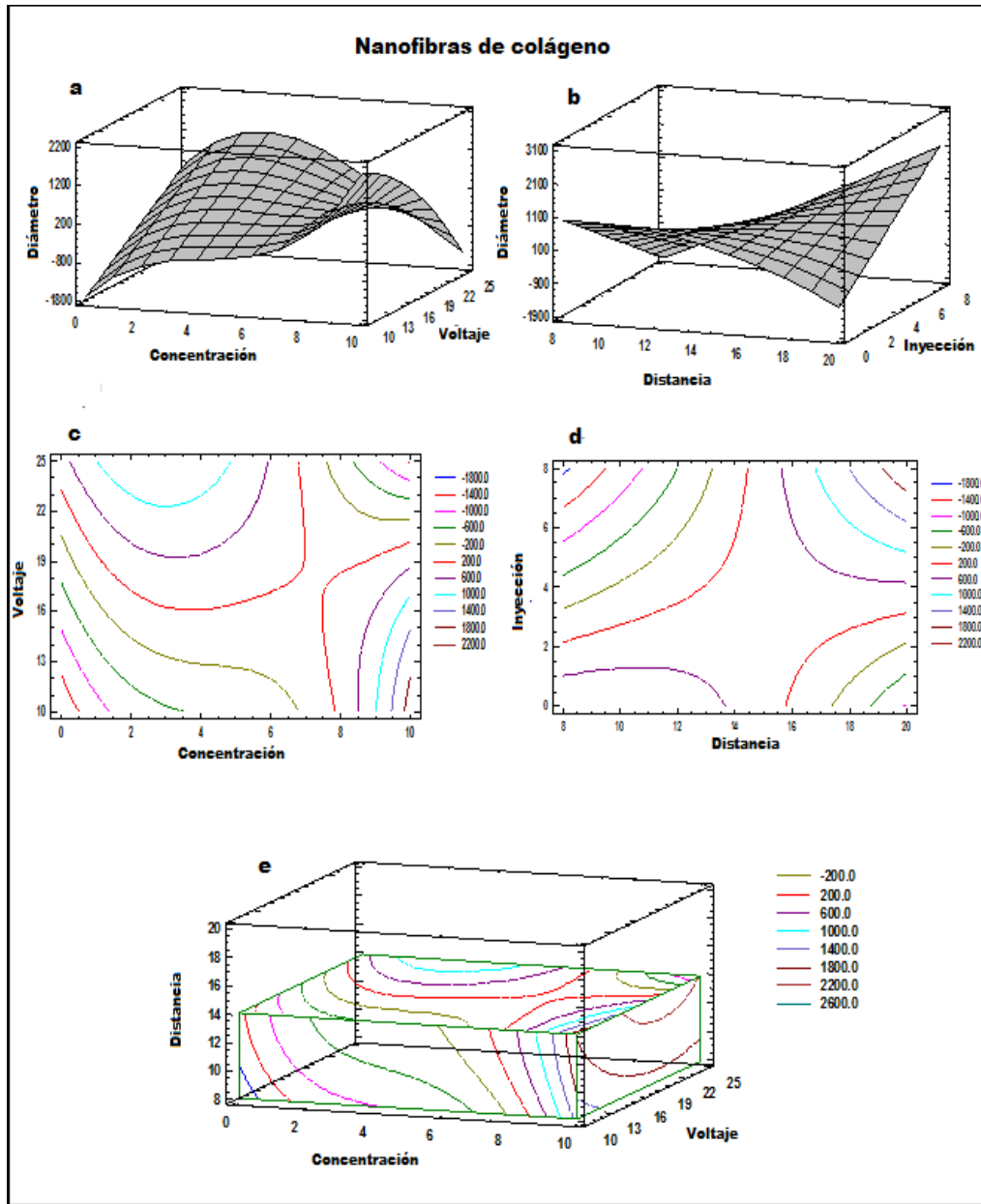


Figura 13 Resultados de la interacción de parámetros de la síntesis de nanofibras de colágeno.

b) Nanofibras de gelatina

La influencia de los diferentes parámetros de electrohilado en la síntesis de nanofibras de gelatina se muestra en la Figura 14. Se observa que cuando la concentración y el voltaje aumentan, el diámetro de las nanofibras obtenidas también aumenta (véase las Figuras 14a y 14c), y cuando disminuye la distancia y

aumenta la velocidad de inyección el diámetro las nanofibras crece. Además, a distancias mayores, el diámetro de nanofibras disminuye a baja velocidad de inyección (ver Figuras 14b y 14d). Los diámetros más pequeños de nanofibras se obtienen a distancias más largas, las concentraciones más altas y mayor voltaje aplicado (véase la Figura 14e).

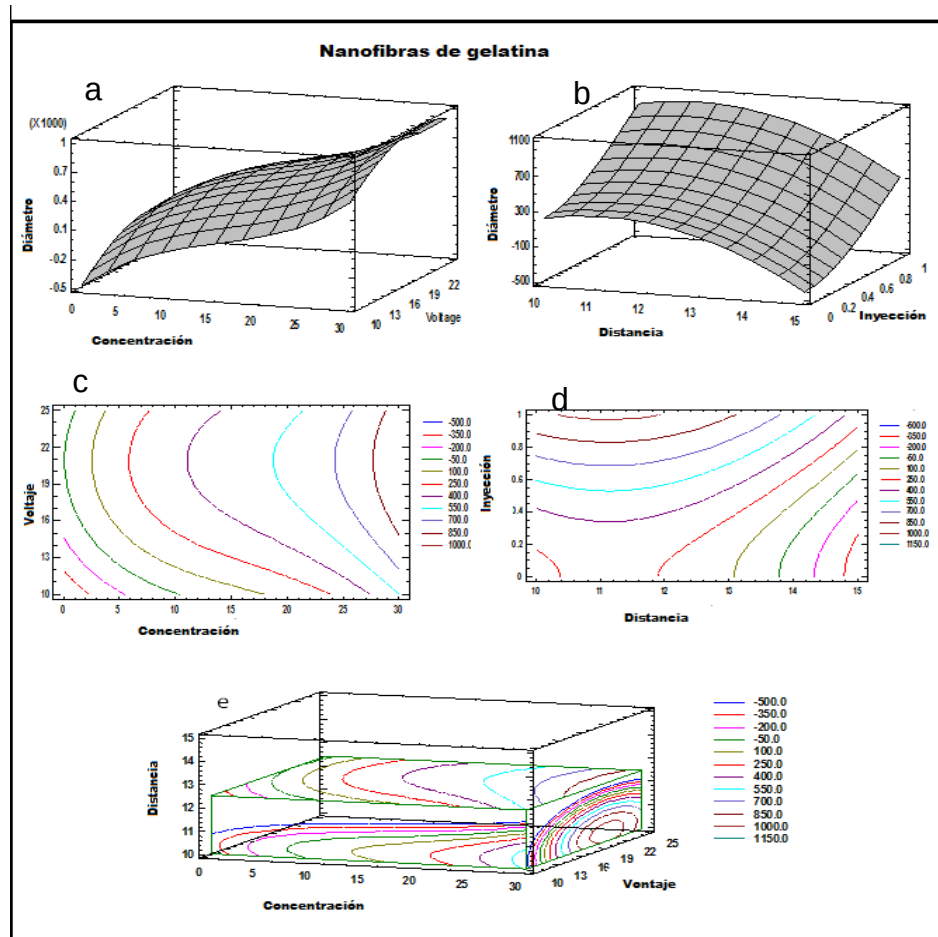


Figura 14 Resultados de la interacción de parámetros de la síntesis de nanofibras de gelatina.

c) Nanofibras de quitosano

Finalmente, la Figura 15 muestra la influencia de los diferentes parámetros en el diámetro de las nanofibras de quitosano. En este caso, concentraciones más bajas y voltajes bajos resultan en un diámetro inferior, y cuando la concentración y el voltaje aumentan los diámetros aumentan también (ver figuras 15a y 15c).

Además, cuando la distancia disminuye y la velocidad de inyección aumenta, el diámetro de la fibra disminuye (véase la figura 15b y 15d). Los diámetros más pequeños de las nanofibras se obtienen a menor valor de voltaje, distancia y concentración aplicados (Figura 15e).

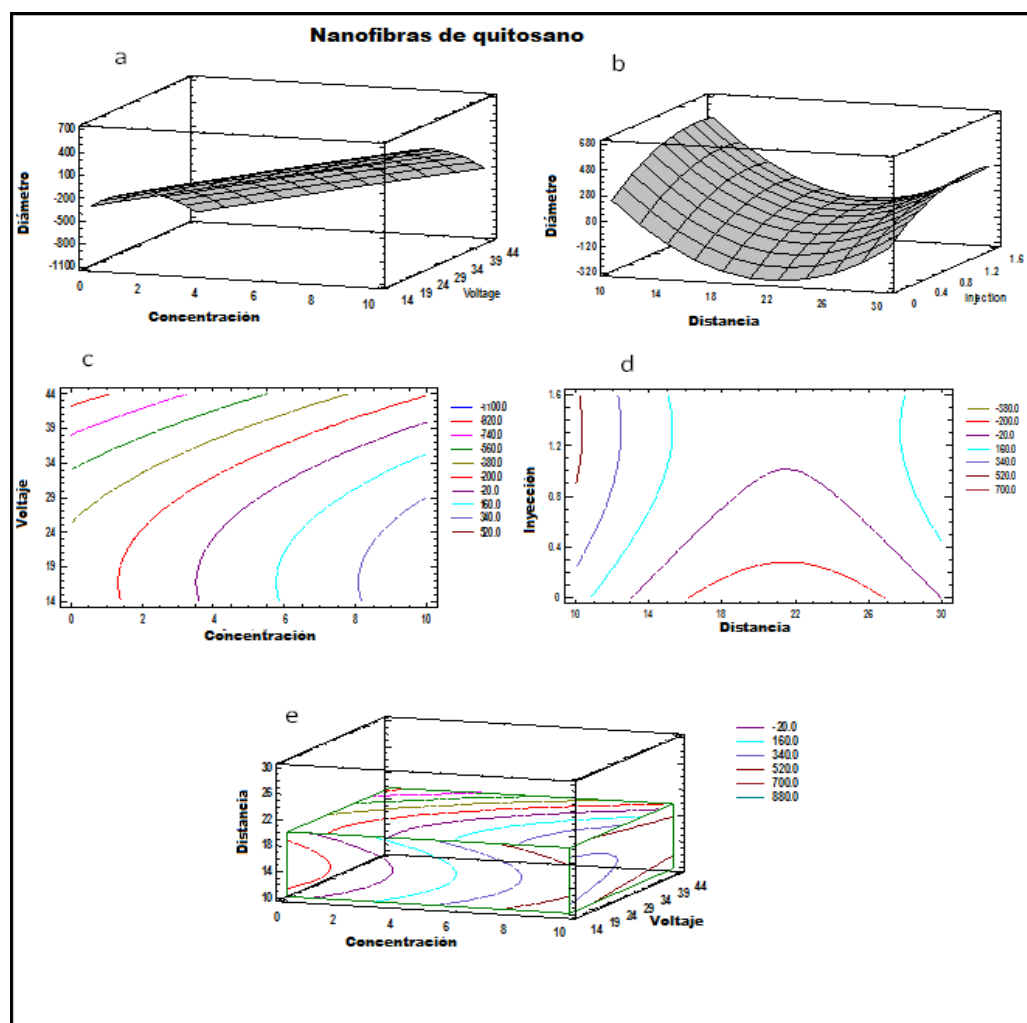


Figura 15 Resultados de la interacción de parámetros de la síntesis de nanofibras de quitosano.

2.2.9 Resultados de optimización.

Los resultados óptimos obtenidos para los diferentes polímeros considerados se muestran en la Tabla 10. Se puede observar que la mejor solución económica implica el uso del polímero gelatina; mientras que el uso de quitosano proporciona una solución con un costo moderado, pero con el diámetro

mínimo. El colágeno representa el peor escenario económico con un diámetro moderado. Para un análisis más detallado, la curva de Pareto presentada en la Figura 6 muestra el equilibrio entre el costo y el diámetro. Las curvas de Pareto representan un conjunto de soluciones óptimas que compensan los objetivos económicos y de diámetro para la nanofibra. Esto es, las soluciones por encima de la curva representan soluciones sub-óptimas, mientras que las soluciones por debajo de la curva son soluciones no factibles. Esta curva de Pareto puede ser muy útil para determinar los costos mínimos y condiciones de operación para la síntesis de una nanofibra con un diámetro específico.

Se observa en la Figura 16 que en las nanofibras de colágeno para diámetros inferiores a ~ 10 nm, el costo de producción de nanofibras por miligramo es de \$ 488,97 dólares. Sin embargo, para diámetros de ~ 10 nm a ~ 400 nm, el costo de producción por miligramo es \$ 107.08 dólares, mientras que para diámetros superiores a ~ 400 nm el costo de producción por miligramo es \$ 106.96 dólares. Cuando los diámetros son bajos, la concentración de la solución polimérica tiende a $\sim 1,3$ (% w / v), el voltaje a $\sim 14,5$ kV, la distancia a ~ 10 cm, la velocidad de inyección a $\sim 0,885$ ml / hr y la temperatura tiende a $\sim 23^\circ$ C. Sin embargo, cuando el diámetro es mayor, la concentración tiende a $\sim 9,9$ (% w / v), el voltaje a $\sim 22,5$ kV, la velocidad de inyección a $\sim 0,10$ ml / h, la temperatura tiende a $\sim 26^\circ$ C y la distancia es constante.

Con respecto a las nanofibras de gelatina, para diámetros inferiores a ~ 10 nm, el costo asociado por miligramo es \$ 25,5 dólares. Pero para nanofibras diámetros entre ~ 10 a ~ 700 nm el costo asociado por miligramo de nanofibras es de \$1,46 dólares, mientras que por encima de ~ 700 nm de diámetro de nanofibras el costo es de \$1,45 dólares. Cuando los diámetros son bajos la concentración de la solución polimérica tiende a $\sim 2,12$ (% w / v), la tensión a $\sim 10,5$ kV, la distancia a $\sim 10,5$ cm, la velocidad de inyección a $\sim 0,79$ ml / h y la temperatura tiende a $\sim 19^\circ$ C. Sin embargo, cuando el diámetro es mayor la concentración tiende a ~ 30 (% w / v), el voltaje a ~ 25 kV, la velocidad de inyección a $\sim 0,10$ ml / h, la temperatura tiende a $\sim 27^\circ$ C y la distancia es constante.

En las nanofibras de quitosano, para diámetros inferiores a ~ 50 nm el costo de producción por miligramo es \$ 15.23 dólares. Y para diámetros entre ~ 10 nm y 180 nm, el costo es de \$6,85 dólares, para diámetros mayores de ~ 180 nm, el costo es de \$6,82 dólares. Cuando los diámetros son bajos la concentración de la solución polimérica tiende a $\sim 4,5$ (% w / v), el voltaje a ~ 14 kV, la distancia a ~ 12 cm, la velocidad de inyección a $\sim 0,05$ ml / h y la temperatura tiende a $\sim 20^\circ$ C. Sin embargo, cuando el diámetro es mayor la concentración tiende a ~ 10 (% w / v), el voltaje a ~ 34 kV, y la distancia, la velocidad de inyección y la temperatura son constantes.

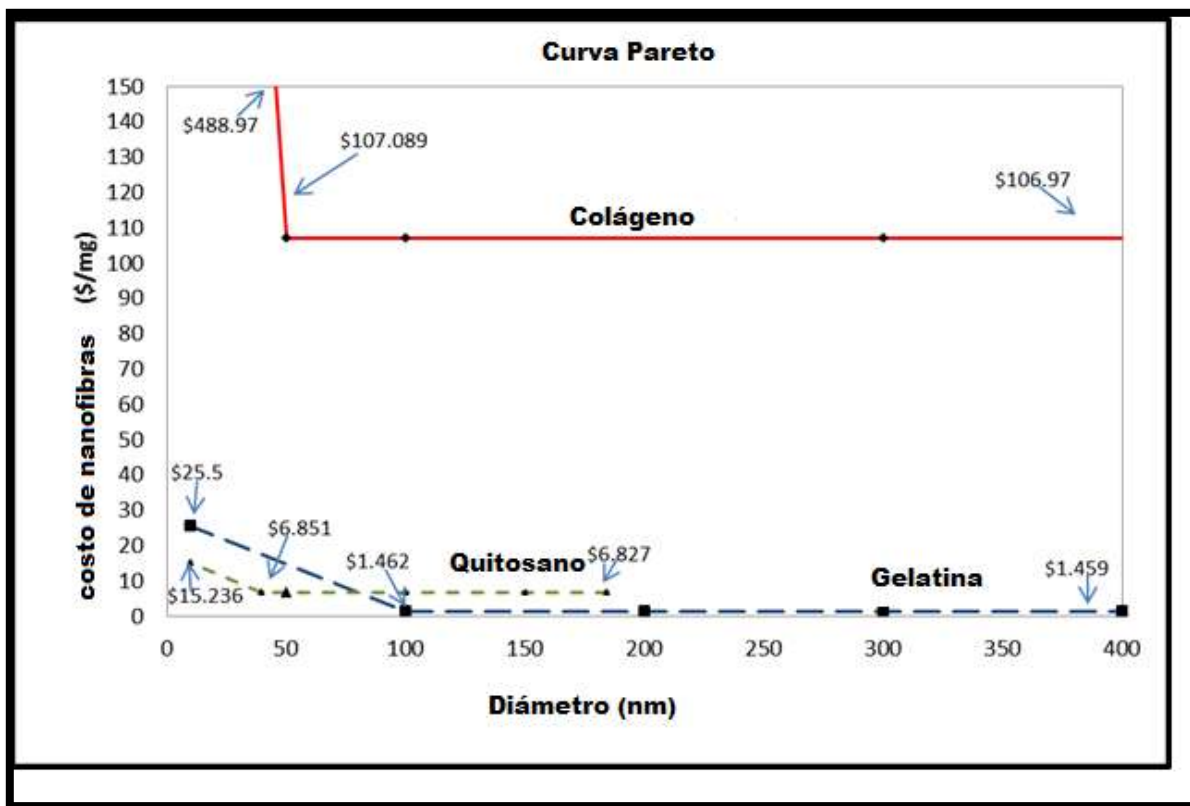


Figura 16 Curvas Pareto de la síntesis de nanofibras.

Para las nanofibras de colágeno el parámetro que afecta en mayor medida al diámetro es la concentración del polímero. Se determinó que el aumento de la concentración y el voltaje producen nanofibras con menor diámetro. Cuando la distancia disminuye y la velocidad de inyección aumenta el diámetro aumenta en

la misma proporción. El diámetro de las nanofibras aumenta cuando la distancia disminuye. Las fibras de diámetros más pequeños se obtienen cuando la distancia es mayor, a concentraciones y voltajes menores. Para las nanofibras de gelatina, el diámetro aumenta cuando se trabajan distancias bajas y velocidades de inyección altas. También, a distancias más grandes, el diámetro de nanofibras disminuye a una velocidad de inyección baja. Los diámetros más pequeños se obtienen a distancias mayores, mayor concentración y mayor voltaje aplicado. Para el caso de las nanofibras de quitosano, cuando se trabaja con concentración y voltaje bajos, el diámetro de las nanofibras disminuye, y cuando la concentración y el voltaje aumentan el diámetro también aumenta. Los diámetros más pequeños se obtienen cuando se trabajan voltaje, distancias y concentraciones bajas. En cuanto a la optimización económica, los resultados óptimos obtenidos para los diferentes polímeros considerados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10 Parámetros de electrohilado y costos.

Concepto/Polymer	Colágeno	Gelatina	Quitosano
Costo (\$/mg de nanofibras)	\$106.956	\$1.459	\$6.827
Diámetro (nm)	400.75	748.29	184.38
Concentración (%w/v)	9.900	30.000	10.000
Voltaje (kV)	22.500	25.000	34.000
Distancia (cm)	11.000	10.000	10.000
Velocidad de alimentación (mL/hr)	0.100	0.100	0.050
Temperatura (° C)	26.000	27.000	20.000

2.3 Conclusiones parciales del capítulo.

Debido a la importancia de los nanomateriales actualmente en el mundo, el estudio y desarrollo de éstos así como la búsqueda de aplicaciones nuevas se han convertido en un factor clave para los avances tecnológicos, por otro lado la optimización de los procesos de síntesis de estos materiales es del mismo modo de suma importancia y el contar con modelos matemáticos adecuados de la síntesis de bionanomateriales por diferentes métodos sería de gran ayuda para el diseño, escalamiento, operación y optimización del proceso.

La optimización del proceso de electrohilado para la síntesis de nanofibras permite relacionar características deseadas de las fibras como el diámetro y la calidad, considerando las variables de mayor influencia como son el voltaje aplicado, la velocidad de inyección, la distancia entre la aguja y el colector, la concentración de la solución polimérica y la temperatura de operación. Se encontró que el polímero gelatina es más viable que el colágeno y el quitosano en cuanto a costos pero generando fibras de mayor diámetro.

Se analizaron tres diferentes tecnologías para la síntesis de nanotubos de carbono: descarga de arco, ablación láser y deposición química en fase vapor, considerando la calidad del producto, el rendimiento, el costo y la seguridad del proceso se concluye que el método de deposición química en fase vapor es el más viable para la obtención de éstos materiales.

Capítulo III SÍNTESIS DE NANOMATERIALES

En ésta sección se presenta la síntesis de los nanomateriales (nanofibras poliméricas y nanotubos de carbono). Para la síntesis de las nanofibras poliméricas se emplea la técnica de electrohilado, mientras que para la obtención de los nanotubos de carbono se emplea el método de pirólisis de hidrocarburos que es una variante del método CVD, el cual fue el que arrojó mejores resultados de optimización en el capítulo anterior.

3.1 Síntesis de nanotubos de carbono por el método spray pirólisis

3.1.1 Materiales y Equipos

Considerando el análisis teórico de los métodos de síntesis de NTC realizado en el capítulo anterior, en el cual, se concluyó que el método CVD es el que arroja mayores rendimientos, calidad y baja toxicidad de manera económica se utilizó una variante de ésta técnica para obtener los NTC, el cual, consiste en inyectar una mezcla ferroceno/alfa-pineno a través de un nebulizador a un horno tubular de reacción, el cual es representado en la Figura 17.

En la Tabla 11 se muestran los materiales y reactivos que se utilizaron para la síntesis de los nanotubos de carbono.

Tabla 11 Materiales y Equipos en la síntesis de nanotubos de carbono.

Material	Equipos
Argón alta pureza (99.997%, INFRA)	Horno tubular eléctrico, marca BI Barnstead Thermolyne, modelo 21100.
Alfa-pineno (98%, Aldrich)	Micro nebulizador pediátrico, marca Hudson RCI.
Ferroceno (98%, Aldrich)	Bomba Peristáltica.
	Tubos de cuarzo tipo Vycor

Debido a la alta temperatura empleada, el ferroceno se aglutina en nanopartículas separadas que sirven como centros de crecimiento que formarán la base de los nanotubos. El hidrocarburo es la fuente de carbono, en este trabajo se

utilizó el alfa pineno. Se emplea una bomba peristáltica para el llenado del nebulizador y mantener un nivel constante en el nebulizador de 4 cm³. Se utiliza un flujo de argón de 5 L/min y una temperatura de 800° C. Los NTC se forman dentro de un tubo de cuarzo, los cuales son retirados manualmente para su posterior purificación.

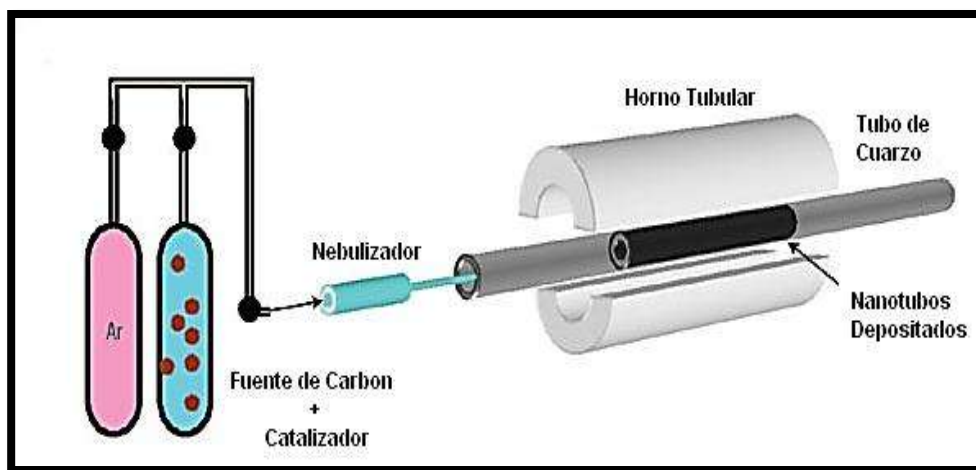


Figura 17 Esquema del método de spray pirólisis.

3.1.2 Purificación y funcionalización de NTC en agua.

La purificación se refiere a la remoción de catalizadores metálicos empleados para la síntesis de los NTC, el método de purificación más empleado es el tratamiento con ácidos.

La funcionalización se define como la modificación de propiedades por la adsorción de átomos o moléculas en las paredes exteriores de los nanotubos de carbono. De esta forma, es posible obtener cambios en las propiedades físicas de la superficie de estos materiales, tales como la solubilidad y dispersión. Estas propiedades son importantes en las aplicaciones biológicas de los NTC ya que les permite tener una mejor Interacción con moléculas biológicas.

Una vez obtenidos los nanotubos de carbono, la purificación y funcionalización de los NTC se realizó por lixiviación de ácidos, esto para lograr generar sitios carboxílicos (-COOH), carbonilos (-C=O) e hidroxilos (-COH) activos,

con la presencia de estos grupos, es posible mejorar la dispersión de los NTC en las soluciones poliméricas (34; 74).

Los reactivos y equipos utilizados para la purificación de los NTC son:

- NTC de pared múltiple
- Agua desionizada (3D), como solvente.
- Ácido clorhídrico.(J. T. Baker, 99% pureza)
- Ácido nítrico. (J. T. Baker, 99% pureza)
- Parrilla eléctrica
- Ultrasonido, marca Fisher Scientific, modelo FS30D.
- Ácido sulfúrico. (J. T. Baker, 99% pureza)
- Horno (Felisa Mufla), Matraz de bola de 1 boca

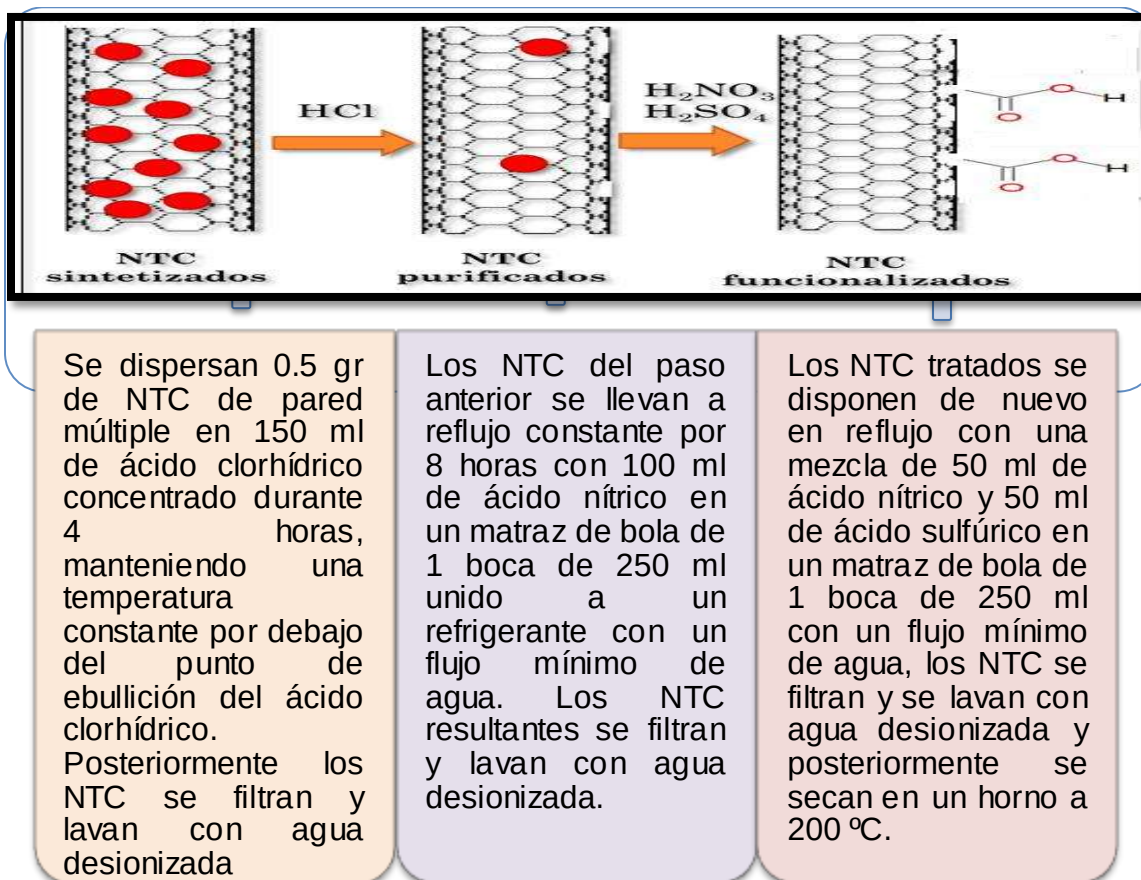


Figura 18 Etapas de purificación y funcionalización de los NTC.

Las etapas de purificación y funcionalización se describen a continuación y de las cuales se muestra un esquema en la Figura 18, en el cual se utilizó el método de lixiviación de ácidos.

En la Figura 19 se muestra el análisis por espectroscopia de infrarrojo de los NTC sintetizados, purificados y funcionalizados. Se observa claramente que en los espectros de los NTC sintetizados y purificados solo se observan algunas señales que corresponden a interferencias del equipo, sin embargo, no se detecta ningún grupo funcional en la superficie de los NTC. Por otro lado, en el espectro de los NTC funcionalizados se observan señales en 1638 y 1331 cm^{-1} que corresponden a los estiramientos simétricos del enlaces C=O y del O-H del grupo carboxílico respectivamente, y en 3221 cm^{-1} una señal que corresponde al estiramiento simétrico del grupo-OH. La presencia de estos grupos funcionales en la superficie sobre los NTC permite lograr una alta dispersión de estos en agua, lo cual es esencial para la combinación con los biopolímeros para la obtención de las nanofibras.

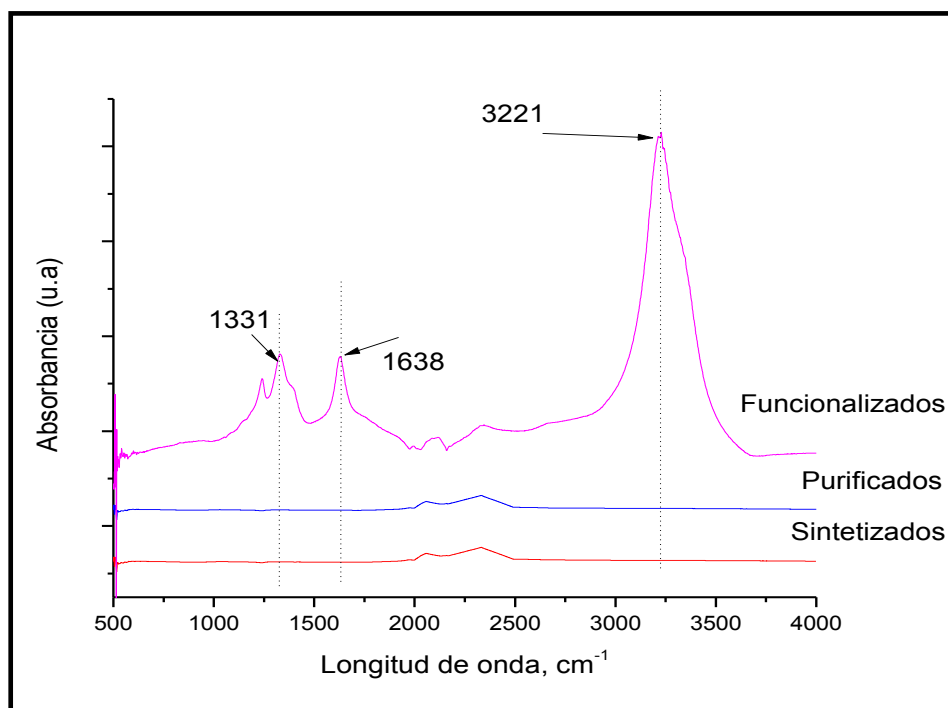


Figura 19 Espectros de Infrarrojo de los NTC antes y después de su purificación y funcionalización.

3.2 Caracterización de nanotubos de carbono.

Después de ser purificados y funcionalizados los NTC, éstos se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

La Figura 20 (a) muestra una imagen de la sección transversal de los NTC de pared múltiple sintetizados. En la imagen se observa la película de NTC directamente adheridos al sustrato de cuarzo utilizado como reactor. La longitud estimada de los NTC es de $\sim 800 \mu\text{m}$ ($\sim 0.8 \text{ mm}$). La Figura 20 (b) es una imagen ampliada de la película de NTC formados, se observan las fibras de carbono alineadas perpendicularmente al sustrato de cuarzo.

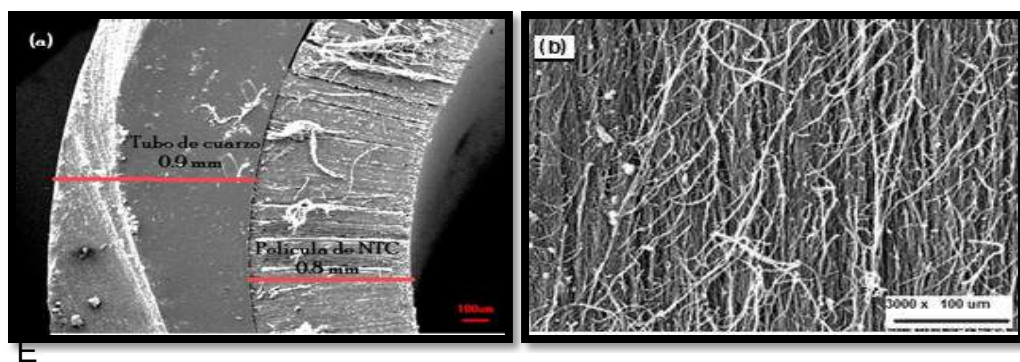


Figura 20 Imágenes SEM de a) la sección transversal de los NTC multicapa con los NTC adheridos al sustrato de cuarzo y b) película de NTC formada.

El análisis por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) se realizó con el fin de conocer más a detalle la morfología de los NTC sintetizados. La Figura 21 (a) corresponde a una imagen de una muestra de NTC purificados obtenida en modo campo oscuro y en la que las secciones de mayor brillo corresponden a la presencia de hierro que proviene del catalizador. Se distinguen dos zonas en las cuales se observa la presencia de hierro: en el interior de los NTC y en su superficie. Las partículas de hierro en el interior de los NTC son alargadas y localizadas a lo largo de los NTC. Las partículas localizadas en el exterior son esféricas con un diámetro aproximado de $\sim 7 \text{ nm}$. A partir de la Figura 21 (b) se puede determinar que el diámetro externo de los NTC es de $\sim 69 \text{ nm}$, el diámetro interno de $\sim 7.8 \text{ nm}$, el número de paredes es de ~ 88 y la distancia entre

807 planos es de 0.34 nm. La alta alineación de las paredes de los NTC, tanto
808 externas como internas, así como su separación homogénea sugiere que los NTC
809 sintetizados son altamente cristalinos.

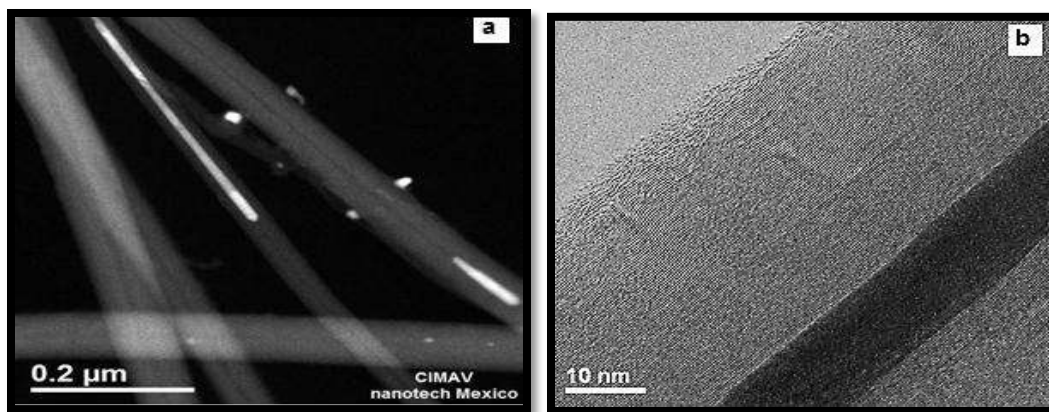


Figura 21 Imágenes HR-TEM de los NTC sintetizados: (a) imagen de campo oscuro donde se muestra la presencia de hierro y (b) imagen ampliada de los NTC.

810 La caracterización termogravimetría, TGA, permite determinar la estabilidad
811 térmica de los NTC así como el contenido de metales. La Figura 22 muestra los
812 resultados del análisis termogravimétrico realizado a los NTC sintetizados. Se
813 puede observar una pequeña pérdida de peso del 2% que ocurre entre 100° C y
814 360° C, y que puede ser asignada a la pérdida de humedad adsorbida en la
815 superficie de los NTC, la descomposición de residuos orgánicos y la oxidación de
816 carbono amorfo formado durante la síntesis de los NTC. La oxidación de los NTC
817 inicia a una temperatura de 510° C y termina a 695° C, originando una pérdida de
818 masa del 92.6%.

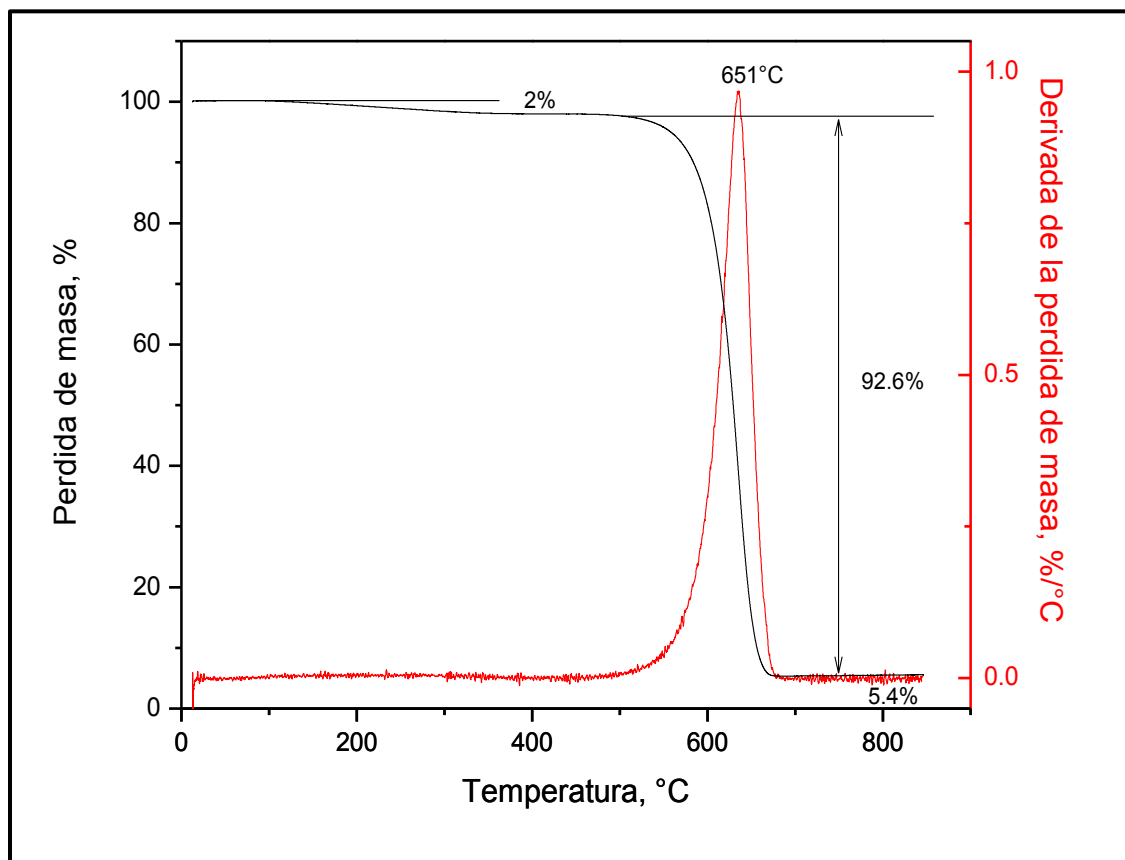


Figura 22 Análisis termogravimétrico de los NTC sintetizados.

3.3 Síntesis de nanomateriales poliméricos.

3.3.1 Nanofibras poliméricas

3.3.1.1 Materiales y Equipos para síntesis de nanofibras.

Para la síntesis de las nanofibras poliméricas se utilizó el método de electrohilado, el cual, consiste en inyectar una solución polimérica mediante una bomba de inyección, dicha solución es sometida a una descarga eléctrica, la cual adelgaza el flujo de la solución polimérica evaporando el solvente y obteniéndose hilos del polímero a escala nanométrica, los cuales son recolectados en un colector metálico, a los cuales se les da el nombre de nanofibras.

En la Tabla 12 se muestran los materiales y reactivos utilizaron para la síntesis de las nanofibras poliméricas.

Tabla 12 Materiales y Equipos para la síntesis delas nanofibras poliméricas.

Material	Equipos
Colágeno tipo II (Sigma)	Parrilla eléctrica de agitación (Thermo Scientific, modelo SP131325)
Ácido hialurónico (Sigma)	Equipo de electrohilado (Nabond)
1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (99% sigma)	Bomba de inyección (Kd Scientific, modelo LEGATO200)
Sulfato de condroitina (Sigma)	
Alcohol polivinílico (Sigma)	

Las soluciones poliméricas fueron preparadas en las proporciones indicadas en la Tabla 13.

Tabla 13 Condiciones para la preparación de las soluciones poliméricas.

Polímero	Solvente	Concentración
Colágeno	1,1,1,3,3,3 hexafluoroisopropanol	3.2 g polímero/ 100 mL de solvente
Alcohol polivinílico	Agua	8 gr polímero/ 100 mL solvente
Ácido hialurónico	Agua	2.5 gr polímero/ 100 mL solvente
Sulfato de Condroitina	Agua	5 gr polímero/ 100 mL solvente

Las mezclas poliméricas fueron preparadas de acuerdo al diseño experimental representado en la Tabla 14, en la cual se muestran las concentraciones volumen/volumen de cada una de las soluciones poliméricas preparadas anteriormente como se indicó en Tabla 13. Dichas mezclas son empleadas en el electrohilado para la obtención de las nanofibras. La Tabla 15 muestra los parámetros empleados en el electrohilado para la síntesis de las nanofibras poliméricas de cada solución analizada.

Tabla 14 Diseño de experimento para la síntesis de nanofibras poliméricas.

MUESTRA	Colágeno	PVA	SC	HA
1	50%	50%		
2	50%		50%	
3	50%			50%
4	34%	33%	33%	
5	34%	33%		33%
6	34%		33%	33%
7	25%	25%	25%	25%
PVA (Alcohol polivinílico), SC (Sulfato de condroitina), HA (Ácido hialurónico)				

Tabla 15 Condiciones del electrospinning en la síntesis de las nanofibras.

MUESTRA	Voltaje (kV)	Distancia (cm)	Inyección (mL/hr)	Temperatura (°C)
Colágeno/PVA	18	12	3	25
Colágeno/SC	21	10	1.3	26
Colágeno/HA	20	12	2	26
Colágeno/PVA-SC	20	12	1	25
Colágeno/PVA-HA	29	15	1.5	24
Colágeno/SC-HA	23	8	1.5	26
Colágeno/PVA-SC-HA	20	10	2	25

3.3.2 Caracterización de nanofibras poliméricas.

Las nanofibras obtenidas mediante el electrohilado de las soluciones poliméricas preparadas según la metodología explicada en el capítulo III, fueron caracterizadas mediante espectroscopia de infrarrojo, microscopía electrónica de barrido (SEM), calorimetría diferencial de barrido (DSC), capacidad de disolución en pH ácido, base y neutro y el cálculo del grado de hinchamiento para determinar la absorción de agua.

Los resultados son presentados individualmente para cada una de las combinaciones utilizadas.

3.3.2.1 Nanofibras Colágeno/PVA

La Figura 23 representa esquemáticamente la molécula proteica de colágeno y la cadena polimérica de PVA, mostrando la posible interacción de los grupos funcionales al formar el compuesto colágeno-PVA.

El alcohol polivinílico contiene grupos funcionales [OH] que son los que tienen una mayor posibilidad de interacción con el colágeno dada su reactividad. El colágeno por su parte, contiene una sección formada por glicina, prolina e hidroxiprolina con radicales [NH-COO], [NH₂], [C=O] y [OH] con una gran posibilidad de interacción con los grupos funcionales OH del PVA.

El electrohilado se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones mostradas en la Tabla 15.

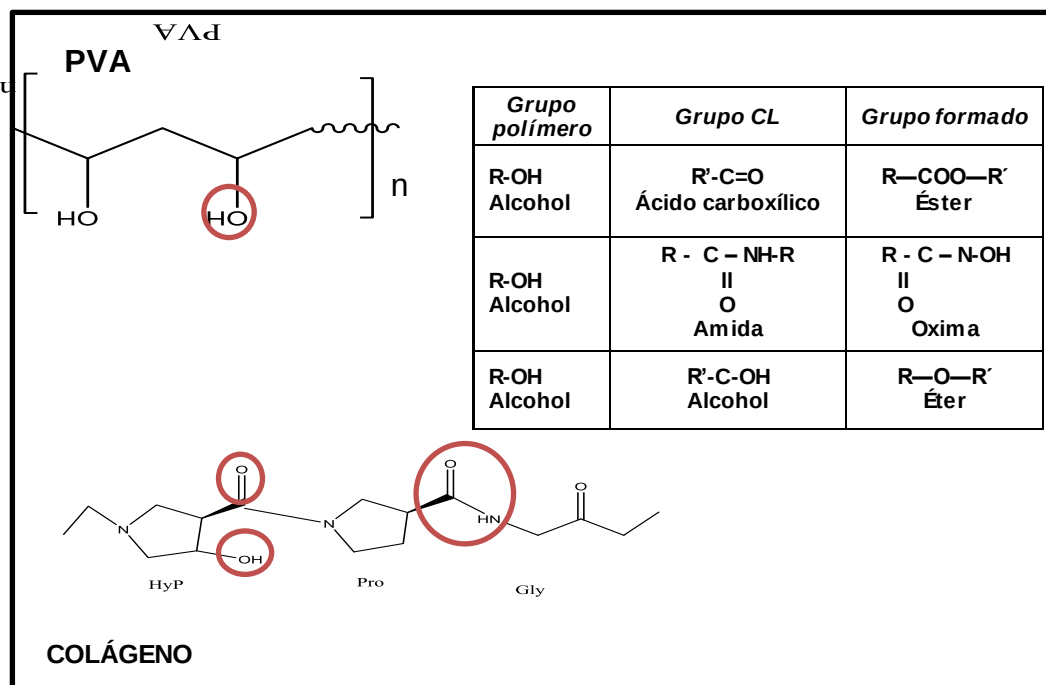


Figura 23 Esquema representativo de nanofibras de colágeno/PVA.

En la Figura 24 se muestran las nanofibras de colágeno -alcohol polivinílico. Estas fibras fueron obtenidas mediante la preparación de una mezcla de colágeno

3.2% (peso/volumen) 1,1,1,3,3, hexafluoro-isopropanol y PVA 8% en agua (peso/volumen), en una proporción 40:60 colágeno: PVA; lo que equivale a 0.32 gr de colágeno y 1.2 gr de PVA por cada 25 mL de solución total.

En la Figura 24 (a) se muestra una fotografía de la película depositada en el colector metálico una vez evaporado el solvente. Se observa una película blanca con textura lisa. En la Figura 24 (b) se presenta una imagen SEM de la fibra donde se observa una superficie lisa, mientras que en las figuras (c), (d) y (e) logradas a una mayor magnificación, se observa como si una capa lisa cubriera la superficie de la fibra, lo que sugiere una separación de fases de la proteína y el polímero. Se observan ramificaciones de las nanofibras con defectos superficiales en forma de bultos, lo que puede ser un indicativo de que la separación de fases impidió la correcta formación de las nanofibras.

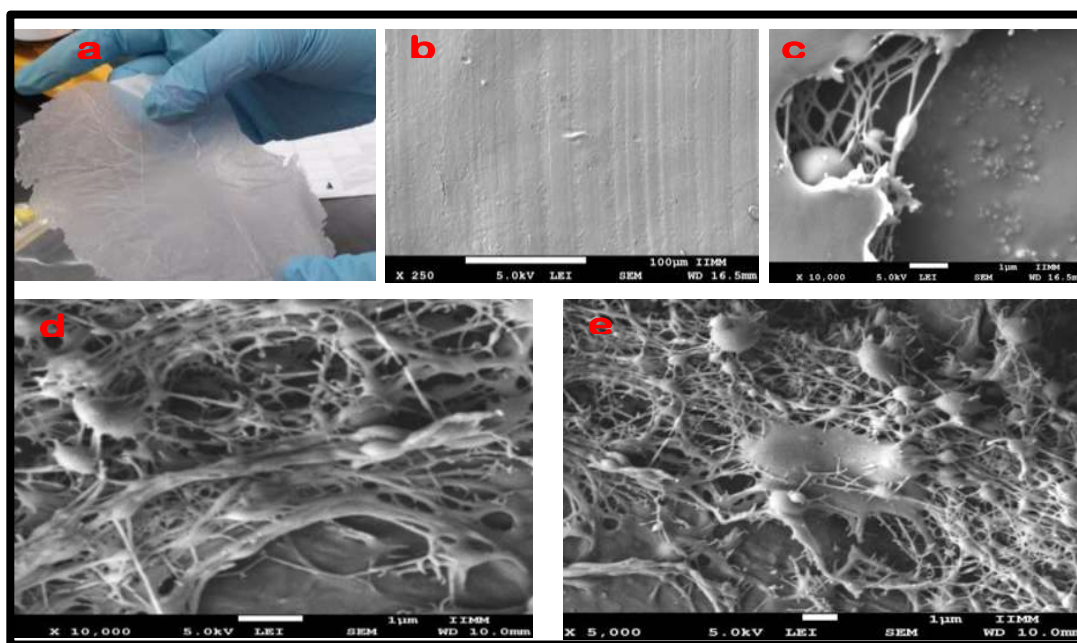


Figura 24 Fotografía (a) e imágenes SEM a diferentes magnificaciones (b, c, d, e) de la fibra colágeno-PVA.

En la Figura 25 se presenta un espectro de infrarrojo de las nanofibras de colágeno-PVA (c) comparado con los espectros de sus componentes individuales colágeno (a) y PVA (b). En la parte superior de la Figura se presenta un

acercamiento del área de 2000 a 700 cm^{-1} con la finalidad de determinar con mayor claridad los cambios en los picos de absorción para el compuesto resultante de la combinación y cada uno de sus componentes individuales.

En la Tabla 16 se muestran las diferentes vibraciones de los principales grupos funcionales del colágeno y del PVA. Estas señales son claramente observadas en la Figura 25.

Tabla 16 Principales vibraciones IR de los grupos funcionales del colágeno y PVA

Colágeno		PVA	
Frecuencia (cm^{-1})	Asignación	Frecuencia (cm^{-1})	Asignación
3290	N-H Tensión + O-H tensión	3290	O-H Tensión
2930	C-H Tensión	2940	C-H Tensión
2850	-CH ₂ Tensión asimétrica	2907	CH ₂ -OH TENSION
1750	C=O Tensión	1417	C-H ₂ Tensión
1640	C-O Tensión + C-N Tensión + N-H flexión	1329	C-OH Deformación
1540	N-H Tensión + C-N Tensión	1142	C-O Movimiento
1454	CH ₃ Flexión asimétrica	1094	-CO-CH ₃ Tensión
1378	CH ₃ movimiento de prolina	913	C-H Tensión
1270	C-N Tensión + N-H flexión + CH ₃ -C tensión	830	C-H Flexión plana
1179	CH ₂ movimiento		
1099	C-C-C Tensión asimétrica		
1030	C-O alcoholes primarios alifáticos.		
890	C-O Tensión		
830	C-H Flexión		

Algunas de las señales de los grupos funcionales del colágeno y del PVA son muy cercanas, por lo que es difícil atribuir bandas en los espectros de las mezclas a colágeno o PVA. Sin embargo se revelan pequeños cambios en los espectros como resultado de la variación de los coeficientes de colágeno / PVA, como son:

912 ❖ Se disminuye la intensidad de las bandas en 3290 cm^{-1} del colágeno
 913 y PVA, lo cual hace suponer que existe interacción entre los grupos
 914 amino e hidroxilo del colágeno con los grupos hidroxilo del PVA.

915

916 ❖ Desaparecen las bandas en 2940 y 2907 cm^{-1} del PVA indicativo de
 917 las interacciones y vibraciones de los grupos C-H de la cadena
 918 polimérica y del alcohol primario R-OH.

919

920 ❖ Desaparece por completo las bandas en 1750 cm^{-1} , 1540 cm^{-1} , 1378
 921 cm^{-1} , 1270 cm^{-1} , 1212 cm^{-1} y 890 cm^{-1} , todas ellas relacionadas a
 922 vibraciones de los enlaces C=O, C-O y N-O del colágeno. Lo que
 923 indica que hay una fuerte interacción entre los grupos C=O del
 924 colágeno y los OH del PVA.

925 Considerando el análisis infrarrojo es posible proponer que la interacción
 926 entre el colágeno y el PVA se da mediante diferentes rutas como se describe a
 927 continuación:

928 ✓ La interacción entre los grupos OH del PVA y los grupos C=O del
 929 colágeno para la formación de éteres. los cuales se detectan en 1090
 930 cm^{-1} .

931 ✓ La interacción entre los grupos OH del PVA y los grupos NH y NH_2
 932 del colágeno para formar oximas $\text{RR}'\text{C}=\text{NOH}$ y amidas, los cuales se
 933 detectan en 1420 cm^{-1} y 1636 cm^{-1} .

934

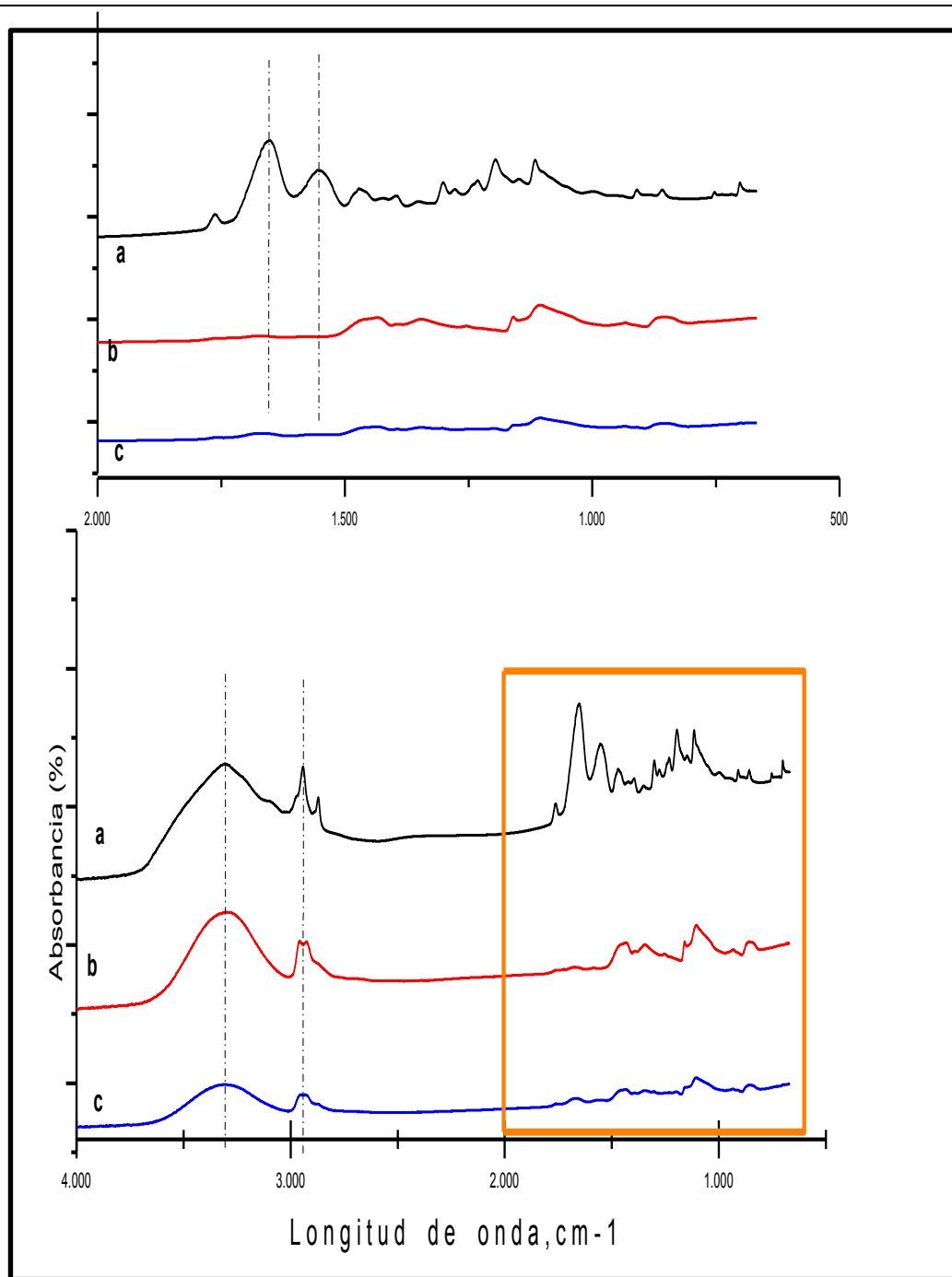


Figura 25 Espectro de infrarrojo para colágeno puro (a), alcohol polivinílico (PVA) puro (b) y el compuesto colágeno-PVA (c)

La Figura 26 el análisis del compuesto colágeno/PVA mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). A través de esta técnica es posible determinar la temperatura de transición vítrea (T_g), la temperatura de cristalización (T_c) y la temperatura de fusión (T_f) del compuesto polimérico.

El análisis DSC se realizó en intervalo de temperatura emprendido entre 25° C y 500° C. El gráfico muestra el flujo de calor aplicado a la muestra como función de la temperatura.

En la parte inferior se muestra una ampliación de la región I mostrada la primera imagen, esta región comprende el intervalo desde 20° C hasta aproximadamente 200° C. A partir de esta ampliación es posible determinar el valor de T_g debido a que la transición vítrea en este análisis se presenta como un escalón, y la T_g es el punto de la curva térmica correspondiente a 1/2 de la diferencia de flujo de calor entre la temperatura de comienzo extrapolada (T_1) y la temperatura de retorno a la línea de base (T_2) en la curva de DSC, tal y como se esquematiza en la ampliación de la región I mostrada en la Figura 26.

La T_g se observa entonces a 77.7° C. El pico característico de cristalización se observa a 158° C, mientras que el de fusión a 170° C. Se observan también dos picos endotérmicos en 224° C y 327° C, atribuibles a la degradación térmica de los componentes de las nanofibras, el colágeno y PVA respectivamente.

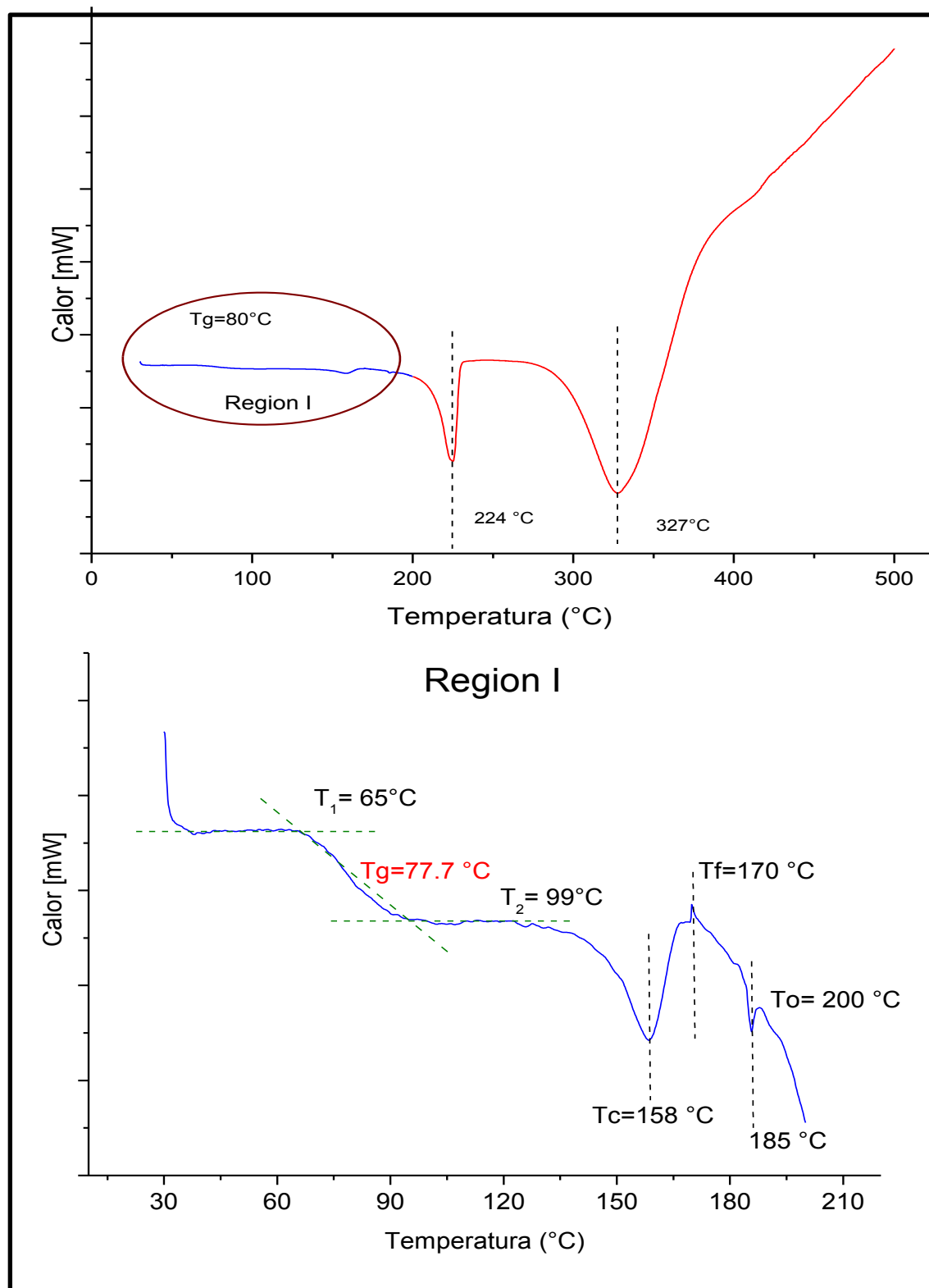


Figura 26 Análisis DSC del compuesto colágeno/PVA

3.3.2.2 Nanofibras Colágeno/SC

En la Figura 27 se presenta el esquema representativo de la molécula proteica de colágeno y la cadena polimérica del sulfato de condroitina mostrando los grupos funcionales que posiblemente interactúan al formar el compuesto colágeno-SC. El sulfato de condroitina contiene grupos funcionales [OH], [C=O], [NH], [SO₃] y [C-O] que son los que tiene mayor probabilidad de interacción con la molécula proteica, de la cual se muestra una sección formada por glicina, prolina e hidroxiprolina con radicales [NH], [N], [C=O] y [OH].

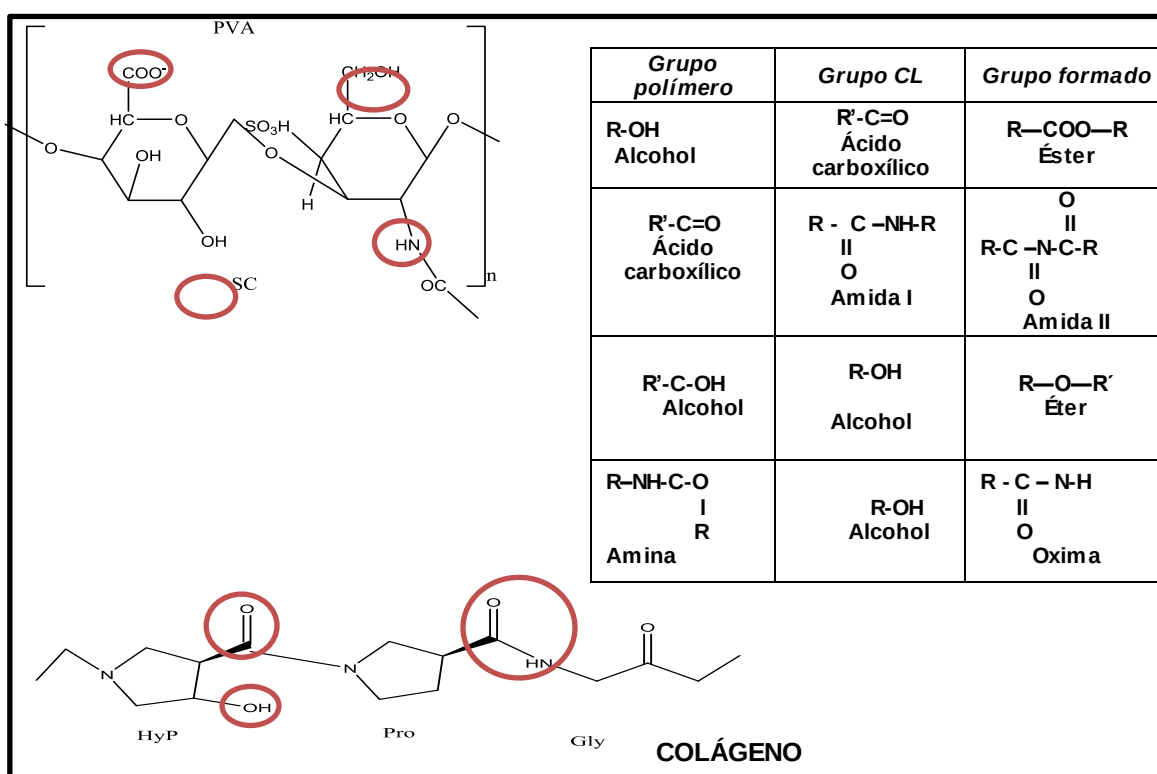


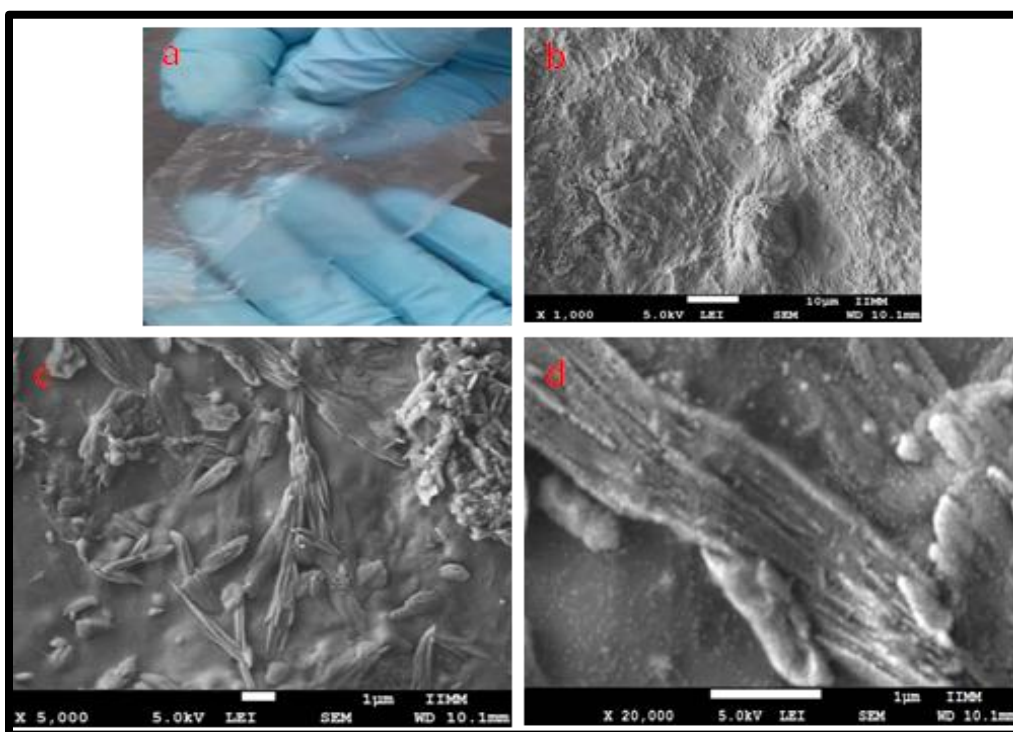
Figura 27 Esquema representativo del compuesto colágeno-SC

En la Figura 28 se observan las nanofibras de colágeno con sulfato de condroitina resultado del proceso de electrohilado. Estas fibras fueron obtenidas mediante la preparación de una mezcla de colágeno 3.2% (peso/volumen) 1,1,1,3,3, hexafluoro-isopropanol y sulfato de condroitina 2.5% en agua (peso/volumen) en proporción 40:60 (colágeno: SC); lo que equivale a 0.32 gr de

1003 colágeno y 0.375 gr de SC por cada 25 mL de solución total. El electrohilado se
1004 llevó bajo las condiciones indicadas en la Tabla 15.

1005 La Figura 28 (a) muestra una fotografía de la fibra en la que se observa una
1006 película un transparente con textura lisa. La Figura 28 (b) presenta una imagen
1007 SEM de esta película donde se observa una superficie rugosa, mientras que en las
1008 figuras (c) y (d) obtenidas a una mayor magnificación mediante SEM, se observa
1009 que no se logró la formación completa de las nanofibras ya que se presentan en
1010 forma de varas gruesas entrecruzadas.

1011 En este caso particular no se obtuvieron nanofibras para esta combinación
1012 a las condiciones de trabajo que se manejaron, esto posiblemente es debido a la
1013 formación de aglomerados gruesos que evitan la alineación y formación de las
1014 nanofibra como tal.



1015

1016 **Figura 28.** Fotografía (a) e imágenes SEM a diferentes magnificaciones (b, c, d)
1017 de la fibra colágeno-sulfato de condroitina.

1018 En los espectros de infrarrojo, tanto de la combinación como de los
1019 componentes individuales mostrados en la Figura 29, se observa claramente las

1020 vibraciones de cada uno de los grupos funcionales presentes en los componentes
1021 individuales, estas vibraciones se indican en la Tabla 17 y para su identificación en
1022 la Figura 29. Tabla 17 Principales vibraciones IR de los grupos funcionales del
1023 colágeno y el SC.

1024 **Tabla 17:** Grupos funcionales del colágeno y sulfato de condroitina

Colágeno		SC	
Frecuencia (cm ⁻¹)	Asignación	Frecuencia (cm ⁻¹)	Asignación
3290	N-H Tensión + O-H tensión	3340	N-H Tensión + O-H Tensión
2930	C-H Tensión	2890	C-H Tensión
2850	-CH ₂ Tensión asimétrica	1600	C O Tensión
1750	C=O Tensión	1558	N-H Flexión
1640	C-O Tensión + C-N Tensión + N-H flexión	1417	C-O Tensión
1540	N-H Tensión + C-N Tensión	1365	C O Flexión asimétrica
1454	CH ₃ Flexión asimétrica	1149	C-O Tensión
1378	CH ₃ movimiento de prolina	1029	C-O tensión
1270	C-N Tensión + N-H flexión + CH ₃ -C tensión	940	Tensión asimétrica del anillo
1179	CH ₂ movimiento	880	-O-SO ₃ Flexión + -C-O-S Flexión
1099	C-C-C Tensión asimétrica		
1030	C-O alcoholes primarios alifáticos.		
890	C-O Tensión		
830	C-H Flexión		

1025

1026 De acuerdo con los espectros IR de colágeno y el SC, algunas posiciones
1027 de sus vibraciones principales están muy cercanas, como resultado es difícil
1028 atribuir cada una de las bandas en los espectros de las mezclas al colágeno o al
1029 SC. Sin embargo se revelan pequeños cambios en los espectros como resultado
1030 de la variación de los coeficientes de colágeno / SC:

1031 ❖ Se disminuye la intensidad en las bandas en 3290 cm⁻¹ del colágeno
1032 y en 3340 cm⁻¹ del SC, lo cual hace suponer que existe interacción

- 1033 entre los grupos amino e hidroxilo del colágeno con los grupos
1034 hidroxilo del CS.
1035
- 1036 ❖ Desaparece la banda en 2890 cm^{-1} correspondiente al movimiento
1037 vibracional del grupo C-H de la cadena polimérica SC.
1038
- 1039 ❖ Desaparece por completo las bandas en 1378 cm^{-1} , 1270 cm^{-1} , 1212
1040 cm^{-1} , 1179 cm^{-1} , 1099 cm^{-1} , 890 cm^{-1} y 830 cm^{-1} , todas ellas
1041 indicativas de vibraciones de los enlaces C=O, C-H, C-N, C-O y N-O
1042 del colágeno.
1043
- 1044 ❖ Se registra un corrimiento de la banda en 1640 cm^{-1} del colágeno
1045 hacia 1636 cm^{-1} , esta banda corresponde al movimiento de los
1046 enlaces C-O, C-N y N-H del colágeno.
1047
- 1048 ❖ Se muestra un corrimiento en la banda en 1029 cm^{-1} del SC
1049 correspondiente a los movimientos del grupo C-O.
1050
- 1051 Considerando el análisis infrarrojo es posible proponer que la
1052 interacción entre el colágeno y el SC se da por medio de diferentes
1053 rutas descritas a continuación:
1054
- 1055 ✓ Formación de esteres por la reacción de ácidos carboxílicos del SC y
1056 alcoholes del colágeno, las cuales son detectadas en 1037 cm^{-1} del
1057 espectro de la combinación colágeno-SC.
- 1058 ✓ Formación de amidas y oximas por la reacción de ácidos carboxílicos
1059 del SC y grupos NH del colágeno, las cuales son detectadas en
1060 1636 cm^{-1} .

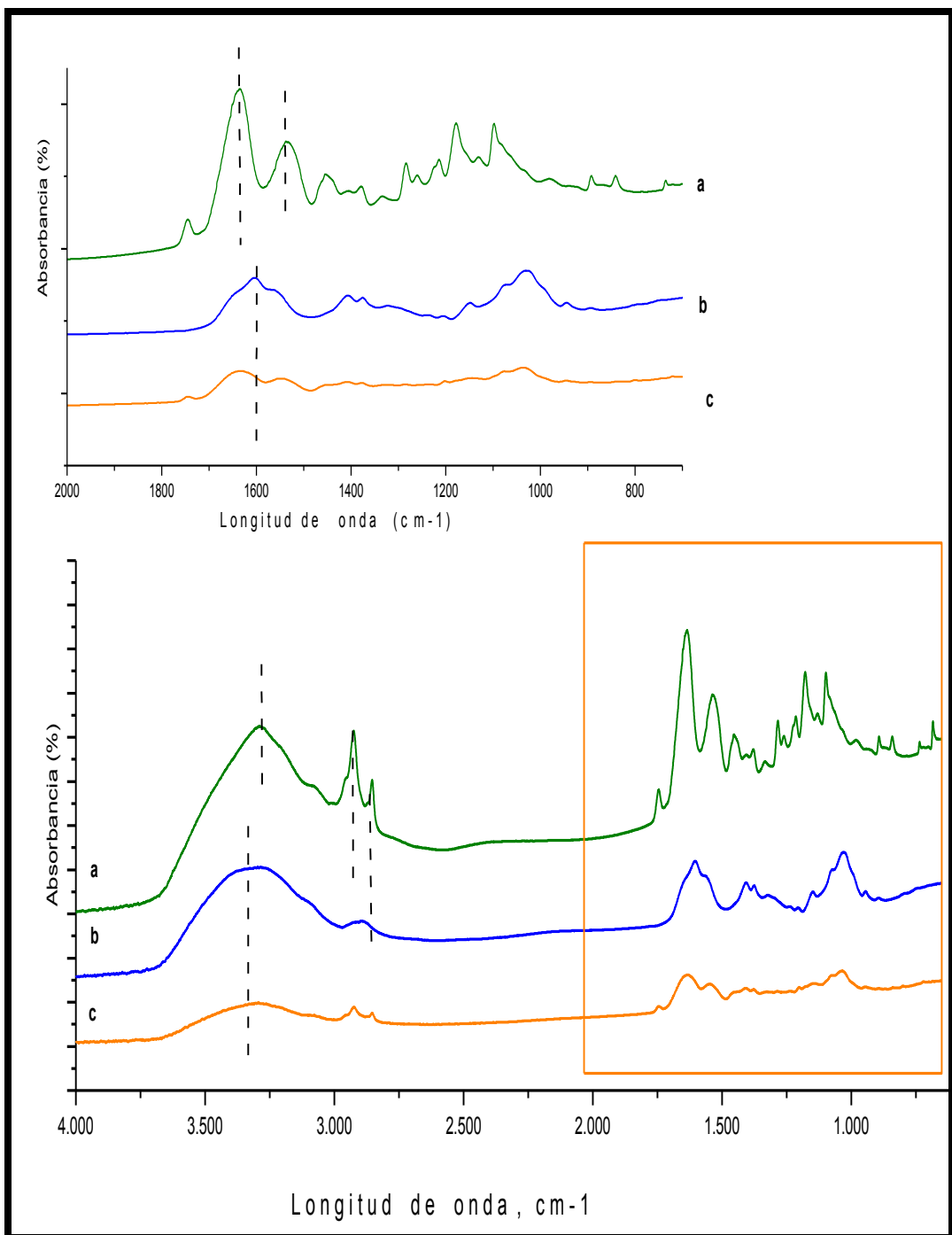


Figura 29 Espectro de infrarrojo para colágeno puro (a), Sulfato de condroitina (SC) puro (b) y el compuesto colágeno-SC (c).

3.3.2.3 Nanofibras Colágeno/HA

El esquema representativo de la molécula proteica de colágeno y la cadena polimérica de ácido hialurónico (HA) mostrando los grupos funcionales que posiblemente interactúan al formar el compuesto colágeno-HA se muestra en la Figura 30. El ácido hialurónico, contiene grupos funcionales [OH], [C=O], [NH-CO] y [C-OO] que son los que tiene mayor posibilidad de interacción con la molécula proteica, de la cual se muestra una sección formada por glicina, prolina e hidroxiprolina con radicales [NH=COO], [N], [C=O] y [OH].

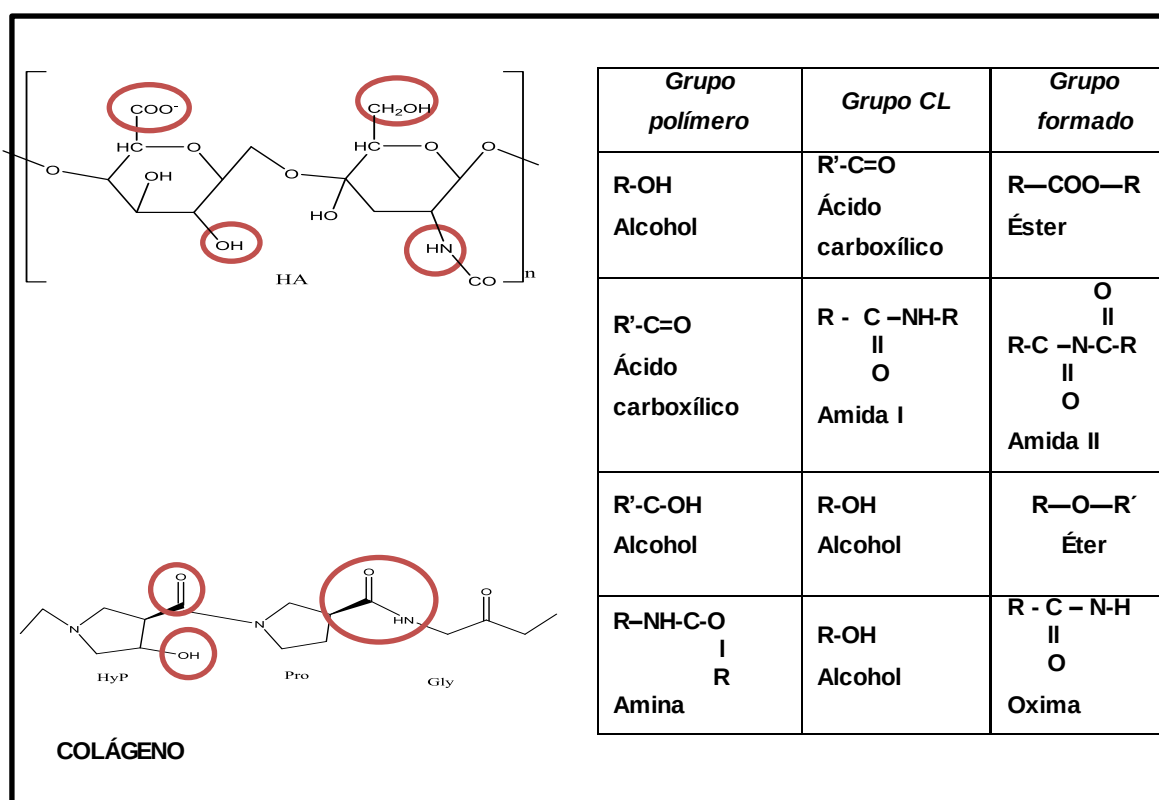


Figura 30 Esquema representativo del compuesto colágeno-HA

En la Figura 31 se presentan las nanofibras de colágeno con ácido hialurónico. Estas fibras fueron obtenidas mediante la preparación de una mezcla de colágeno 3.2% (peso/volumen) 1,1,1,3,3, hexafluoro-isopropanol y HA 0.5% en agua (peso/volumen) en proporción 40:60 (colágeno:HA); lo que equivale a 0.32 gr de colágeno y 0.075gr de HA por cada 25 mL de solución total. El electrohilado se llevó a cabo bajo las condiciones mostradas en la Tabla 15.

En la Figura 31 (a) se muestra una fotografía de la película obtenida una vez sometida la mezcla al proceso de electrohilado. Se observa una película blanca, transparente y con textura lisa. La Figura 31 (b) presenta una imagen SEM de la película donde se observa una superficie rugosa con algunos defectos superficiales, mientras que Figuras (c) y (d) obtenidas a mayores magnificaciones en SEM muestran ramificaciones como un indicio del inicio de formación de las nanofibras, sin embargo pero éstas no se lograron formar completamente, presentando una gran cantidad de defectos.

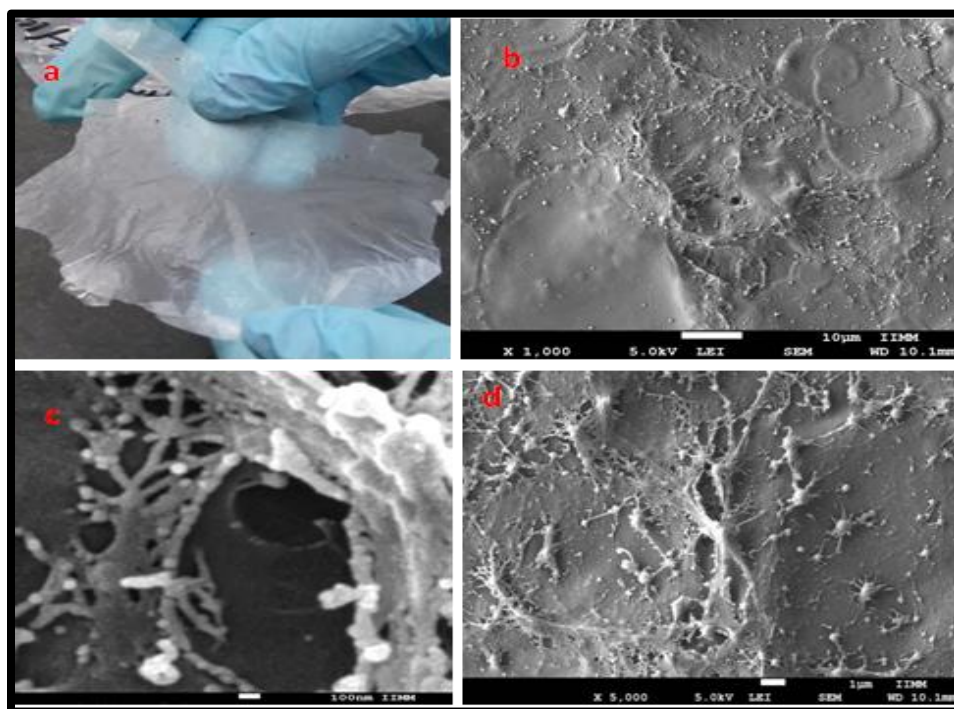


Figura 31 Fotografía (a) e imágenes SEM de la fibra colágeno-ácido hialurónico a diferentes magnificaciones (b, c, d).

En la Tabla 18 se muestran las vibraciones características de los principales grupos funcionales del colágeno y del HA. Debido a la cercanía que existe entre las posiciones de las bandas de absorción de los picos del espectro IR entre el colágeno y el HA, es difícil asignar las bandas en los espectros de las mezclas al colágeno o al HA. Sin embargo se revelan pequeños cambios en los espectros como resultado de la variación de los coeficientes de colágeno-HA:

- 1110 ❖ Se disminuye la intensidad de las bandas en 3290 cm^{-1} del colágeno
1111 y 3330 cm^{-1} del HA, lo cual hace suponer que existe interacción entre
1112 los grupos amino e hidroxilo del colágeno con los grupos hidroxilo del
1113 HA.
- 1114
1115 ❖ Desaparece la banda en 2877 cm^{-1} correspondiente al movimiento
1116 vibracional del grupo C-H de la cadena polimérica HC.
- 1117
1118 ❖ Desaparecen por completo la bandas en 1378 cm^{-1} , 1270 cm^{-1} , 1212
1119 cm^{-1} , 1179 cm^{-1} , 1099 cm^{-1} , 890 cm^{-1} y 830 cm^{-1} , todas ellas
1120 indicativas de vibraciones de los enlaces C=O, C-H, C-N, C-O y N-O
1121 del colágeno.
- 1122
1123 ❖ Se registra un corrimiento de la banda correspondiente al vibraciones
1124 del grupo C-H del colágeno, desde 2930 cm^{-1} hacia 2924 cm^{-1} .
- 1125
1126 Considerando el análisis infrarrojo se propone que la interacción
1127 entre el colágeno y el HA se da mediante diferentes rutas como se
1128 menciona a continuación:
- 1129
1130 ✓ Formación de esteres por la reacción de ácidos carboxílicos del SC y
1131 alcoholes del colágeno las cuales son detectadas en 1032 cm^{-1} del
1132 espectro de la combinación colágeno-HA.
- 1133 ✓ Formación de amidas y oximas por la reacción de ácidos carboxílicos
1134 del HA y grupos NH del colágeno, las cuales son detectadas en
1135 1630 cm^{-1} .
- 1136
1137
1138
1139

Tabla 18 Principales vibraciones IR de los grupos funcionales presentes en el colágeno y el HA.

Colágeno		HA	
Frecuencia (cm ⁻¹)	Asignación	Frecuencia (cm ⁻¹)	Asignación
3290	N-H Tensión + O-H tensión	3330	N-H Tensión + O-H Tensión
2930	C-H Tensión	2877	C-H Tensión
2850	-CH ₂ Tensión asimétrica	1605	C O Tensión
1750	C=O Tensión	1563	N-H Flexión
1640	C-O Tensión + C-N Tensión + N-H flexión	1410	C-O Tensión
1540	N-H Tensión + C-N Tensión	1370	C O Flexión asimétrica
1454	CH ₃ Flexión asimétrica	1307	
1378	CH ₃ movimiento de prolina	1148	C-O Tensión
1270	C-N Tensión + N-H flexión + CH ₃ -C tensión	1032	C-O tensión
1179	CH ₂ movimiento	940	Tensión asimétrica del anillo
1099	C-C-C Tensión asimétrica	880	-C-O-S Flexión
1030	C-O alcoholes primarios alifáticos.		
890	C-O Tensión		
830	C-H Flexión		

En la Figura 32 se presenta el espectro de infrarrojo de las nanofibras de colágeno-HA (c) comparado con el espectro de los componentes individuales colágeno (a) y HA (b). En la parte superior de la Figura se muestra un acercamiento del área comprendida entre 2000 y 700 cm⁻¹ con la finalidad de determinar con mayor claridad los cambios en los picos de absorción para el compuesto resultante de la combinación, y respecto a los de sus componentes individuales.

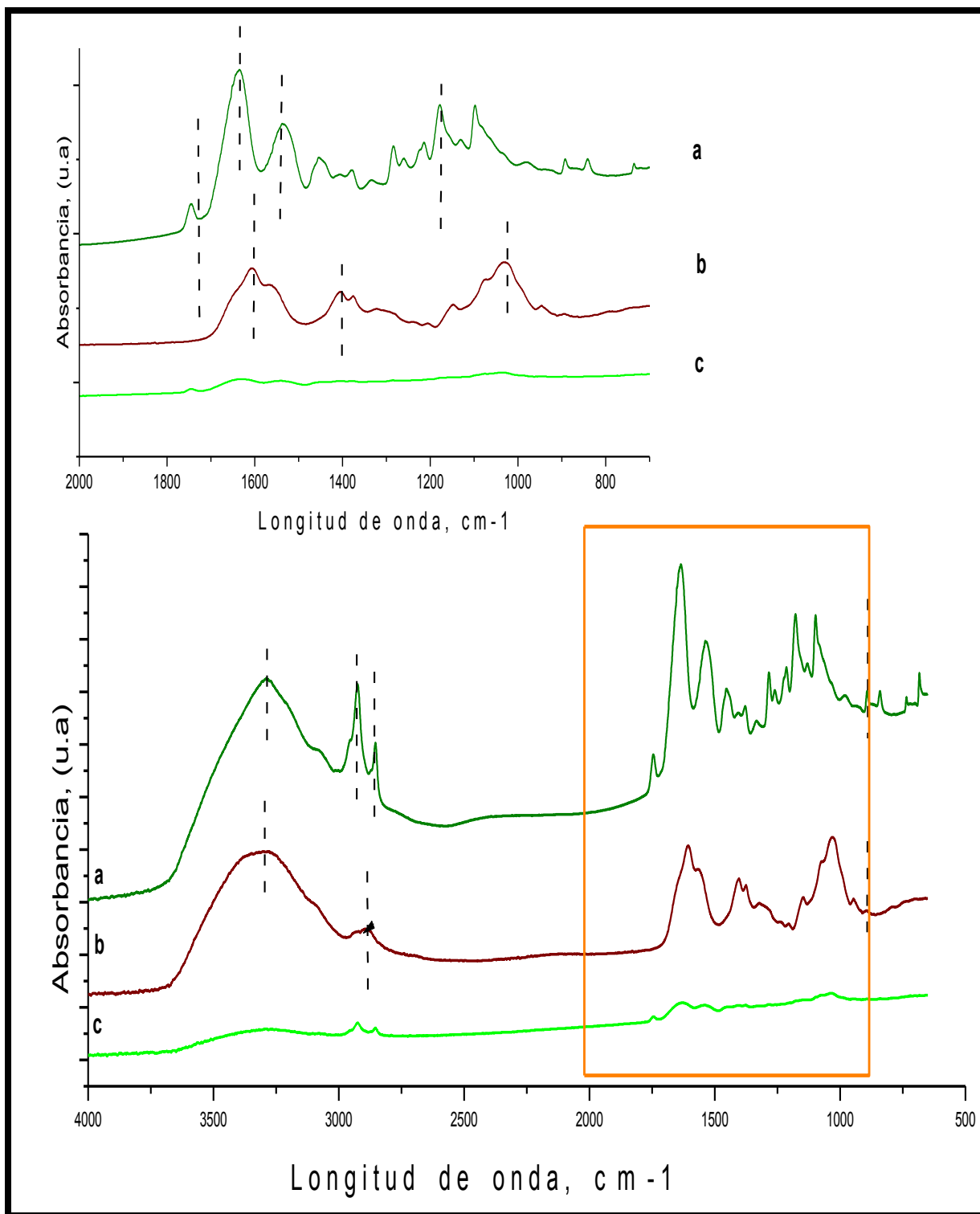


Figura 32 Espectro de infrarrojo para colágeno puro (a), Ácido hialurónico (HA) puro (b) y el compuesto colágeno-HA (c).

3.3.2.4 Nanofibras Colágeno/PVA-SC

En la Figura 33 se presenta de manera esquemática la molécula del colágeno, las cadenas poliméricas de PVA y de sulfato de condroitina (SC). Se muestran los grupos funcionales que posiblemente interactúan al formar el compuesto colágeno-PVA-SC. El alcohol polivinílico contiene grupos funcionales [OH] que son los que tienen una mayor posibilidad de interacción, el sulfato de condroitina contiene grupos funcionales [OH], [C=O], [NH], [SO₃] y [C-O], mientras que el colágeno posee una sección formada por glicina, prolina e hidroxiprolina con radicales [NH], [N], [C=O] y [OH] con posibilidades de interacción.

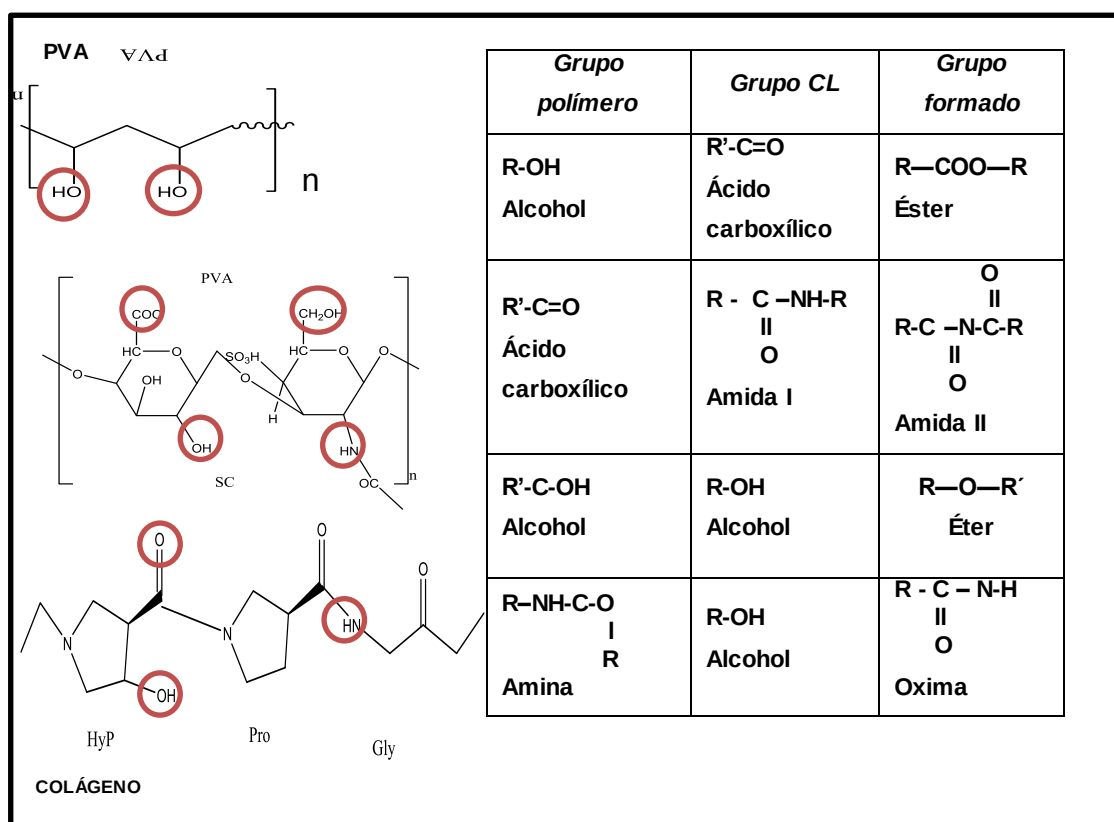


Figura 33 Esquema representativo del compuesto colágeno-PVA-SC.

En la Figura 34 se presentan las nanofibras de colágeno con PVA y ácido hialurónico, resultados del procesamiento de las soluciones en el equipo de electrohilado. Estas nanofibras fueron obtenidas mediante la preparación de una mezcla de colágeno 3.2% (peso/volumen) 1,1,1,3,3, hexafluoro-isopropanol , PVA

8% en agua (peso volumen) y SC 2.5% en agua (peso/volumen) en proporción 25:37.5:37.5 (colágeno:PVA:SC); lo que equivale a 0.32 gr de colágeno, 1.2 gr de PVA y 0.375 gr de SC por cada 40 mL de solución, esta mezcla fue procesada mediante electrohilado bajo las condiciones marcadas en la Tabla 15.

En la Figura 34 (a) se muestra una fotografía de la película blanca opaca con textura lisa resultado del procesamiento mediante electrohilado y la cual se presume que a nivel nanométrico es una colección de nanofibras La Figura 34 (b) presenta una imagen SEM de esta película donde se observan las nanofibras formadas y en las figuras (c) y (d) se observan imágenes SEM de las fibras a diferentes magnificaciones en las cuales se pueden muestran ramificaciones de como un indicio del inicio de formación de las nanofibras, las cuales se forman de manera aleatoria con diámetro promedio de la fibra de 60 nm.

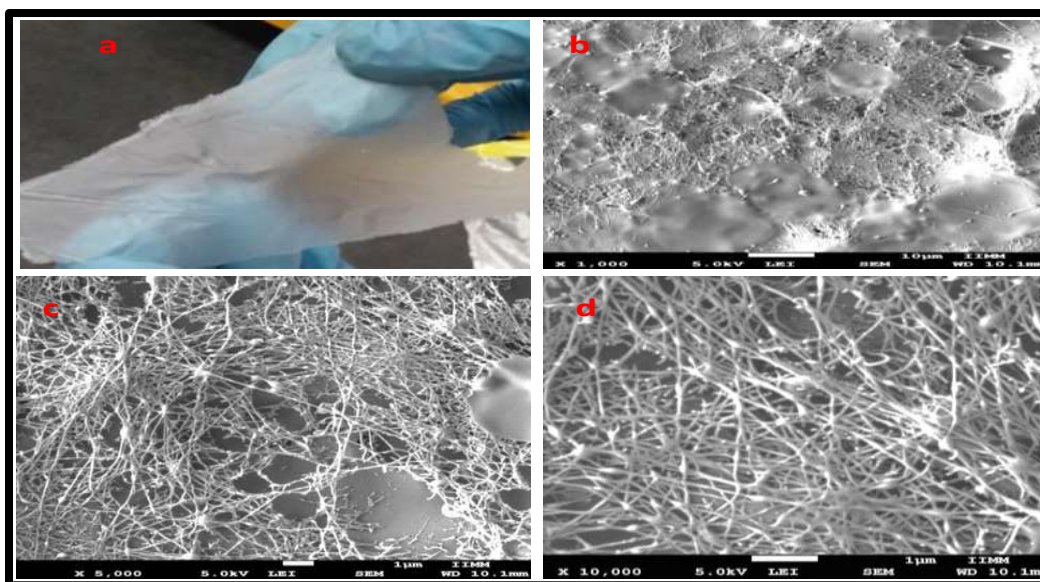


Figura 34 Fotografía (a) e imágenes SEM a diferentes magnificaciones (b, c, d) de la fibra colágeno-PVA-SC.

En las Tablas 17 y 18, descritas anteriormente, se muestran las vibraciones IR características de los principales grupos funcionales del colágeno, el PVA y el SC, las cuales pueden ser asignadas en los espectros IR mostrados en la Figura 35. En la parte superior de la Figura se presenta un acercamiento del área entre 2000 y 700 cm^{-1} para determinar con mayor claridad los cambios en las

1200 vibraciones del compuesto resultante de la combinación respecto de los espectros
1201 de cada uno de sus componentes individuales.

1202 En los espectros IR se observan las vibraciones correspondientes a los
1203 movimientos de los grupos funcionales del colágeno, el PVA y el SC. Igual que en
1204 los casos anteriores, debido a la cercanía que existe entre las posiciones de las
1205 bandas de absorción IR del colágeno, el PVA y el SC es difícil asignar las
1206 vibraciones en los espectros de las mezclas. Sin embargo se revelan pequeños
1207 cambios en los espectros como resultado de la variación de los coeficientes
1208 colágeno-PVA-SC, como son la disminución o desaparición de algunas bandas de
1209 los espectros individuales:

- 1210 ❖ Se disminuye la intensidad de las bandas en 3290 cm^{-1} del colágeno y
1211 el PVA, lo cual hace suponer que existe interacción entre los grupos
1212 amino e hidroxilo del colágeno con los grupos hidroxilo del PVA.
- 1213 ❖ Desaparecen las bandas en 2940 y 2907 cm^{-1} del PVA indicativo de las
1214 interacciones y vibraciones de los grupos C-H de la cadena polimérica y
1215 de alcoholes primarios R-OH.
- 1216 ❖ Desaparece por completo las banda en 1750 cm^{-1} , 1540 cm^{-1} , 1378 cm^{-1} ,
1217 1270 cm^{-1} , 1212 cm^{-1} y 890 cm^{-1} , todas ellas indicativas de
1218 movimientos de los enlaces C=O, C-O y N-O del colágeno. Lo que
1219 indica que hay una fuerte interacción entre los grupos C=O del
1220 colágeno y los OH del PVA.
- 1221 ❖ Se disminuye la intensidad en las bandas en 3290 cm^{-1} del colágeno y
1222 3340 cm^{-1} del SC, lo cual hace suponer que existe interacción entre los
1223 grupos amino e hidroxilo del colágeno con los grupos hidroxilo del CS.
- 1224 ❖ Desaparece la banda en 2890 cm^{-1} correspondiente al movimiento
1225 vibracional del grupo C-H de la cadena polimérica del SC.
- 1226 ❖ Desaparecen por completo las bandas en 1378 cm^{-1} , 1270 cm^{-1} , 1212 cm^{-1} ,
1227 1179 cm^{-1} , 1099 cm^{-1} , 890 cm^{-1} y 830 cm^{-1} , todas ellas indicativas
1228 de vibraciones de los enlaces C=O, C-H, C-N, C-O y N-O del colágeno.

❖ Hay un corrimiento de la banda en 1640 cm^{-1} del colágeno hacia 1636 cm^{-1} correspondiente vibraciones de enlaces C-O, C-N y N-H del colágeno.

❖ Se registra un corrimiento de la banda en 1029 cm^{-1} del SC correspondiente a vibraciones del grupo C-O.

Considerando el análisis infrarrojo podemos proponer que la interacción entre el colágeno, el PVA y el SC se da por medio de diferentes rutas como se menciona a continuación:

✓ Interaccionan los grupos OH del PVA y los grupos C=O del colágeno para formar éteres, los cuales se detectan en 1090 cm^{-1} .

✓ Interaccionan los grupos OH del PVA y los grupos NH y NH_2 del colágeno para formar oximas $\text{RR}'\text{C}=\text{NOH}$ y amidas, los cuales se detectan en 1420 cm^{-1} y 1636 cm^{-1} .

✓ Formación de esteres por la reacción de ácidos carboxílicos del SC y alcoholes del colágeno las cuales son detectadas en 1037 cm^{-1} en el espectro de la combinación colágeno-SC.

✓ Formación de amidas y oximas por la reacción de ácidos carboxílicos del SC y grupos NH del colágeno, las cuales son detectadas en 1636 cm^{-1} .

La Figura 36 muestra el análisis DSC en la cual se despliega el flujo de calor como función de la temperatura de la muestra colágeno/PVA/SC y una respuesta endotérmica. Se determinó el valor de T_g en las curvas DSC por el punto de la curva térmica correspondiente a 1/2 de la diferencia de flujo de calor entre la temperatura de comienzo extrapolada (T_1) y la temperatura de retorno a la línea de base (T_2) en la curva de DSC.

En la Figura 36 se presenta la imagen del estudio termogravimétrico del compuesto CL/PVA-SC, con una ampliación de la región entre 140° C y 190° C para mostrar el cálculo de la $T_g = 163^\circ\text{ C}$, así mismo, se detectan la temperatura de cristalización $T_c = 220^\circ\text{ C}$ y de fusión $T_f = 233^\circ\text{ C}$ del material. Además de estos

picos mencionados se presentan tres pico endotérmicos más, a 243° C, 260° C y 288° C, los cuales se atribuyen a la temperatura de degradación térmica de cada uno de los componentes de la mezcla, el colágeno, sulfato de condroitina y PVA respectivamente.

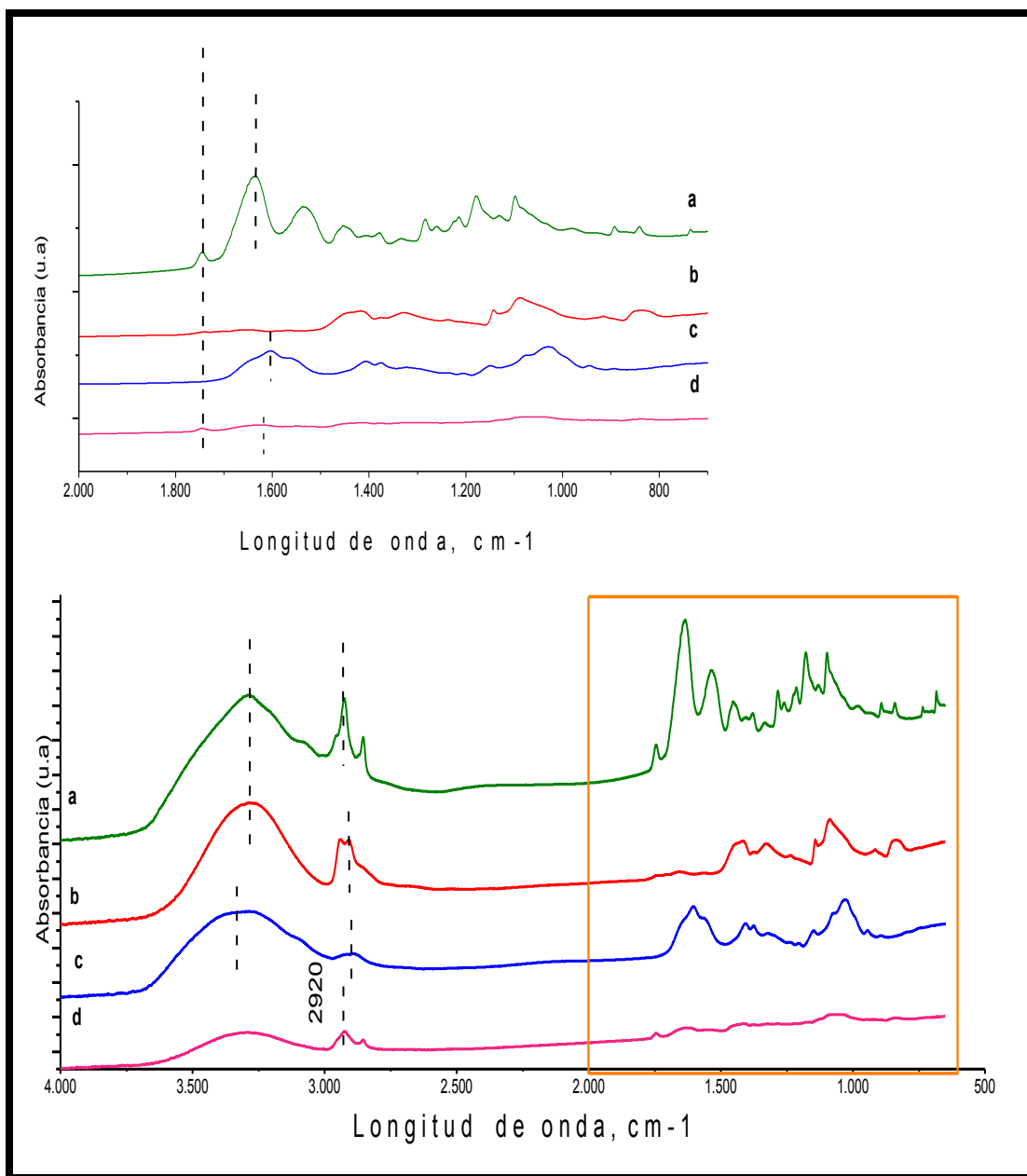


Figura 35 Espectro de infrarrojo para colágeno puro (a), Sulfato de condroitina, PVA (b) puro, (SC) puro (c) y el compuesto colágeno-PVA-SC (d).

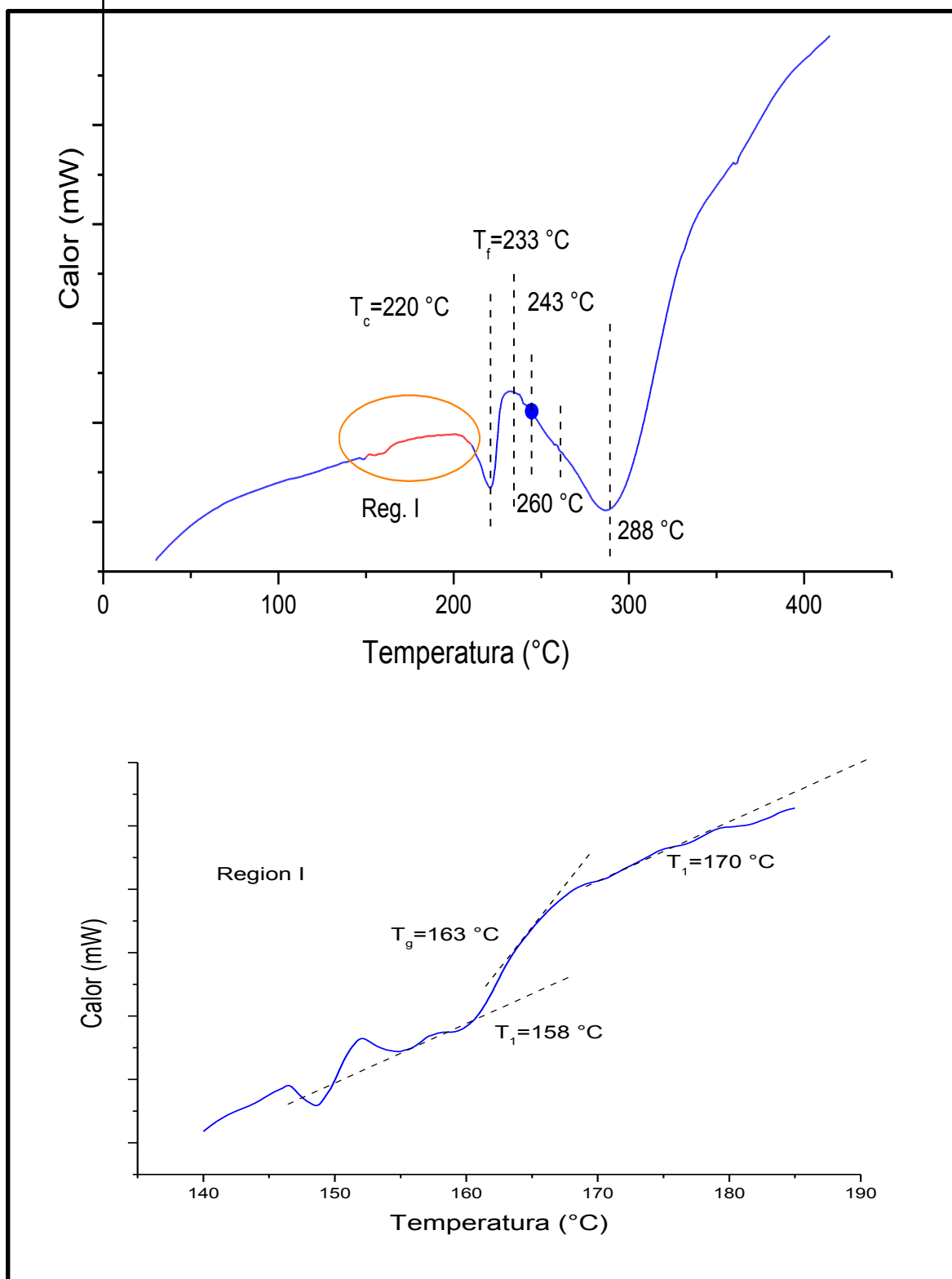


Figura 36 Análisis DSC del compuesto colágeno/PVA-SC.

3.3.2.5 Nanofibras Colágeno/PVA-HA

En la Figura 37 se muestra esquemáticamente las moléculas de colágeno, de PVA y HA, así como sus grupos funcionales que podrían estar interaccionando. Ya se mencionó anteriormente que el PVA posee grupos funcionales [OH], el ácido hialurónico presenta grupos [OH], [C=O], [NH] y [C-O] que son los que tienen posibilidad de interaccionar con el colágeno, del cual se muestra una sección formada por glicina, prolina e hidroxiprolina con radicales [NH], [N], [C=O] y [OH].

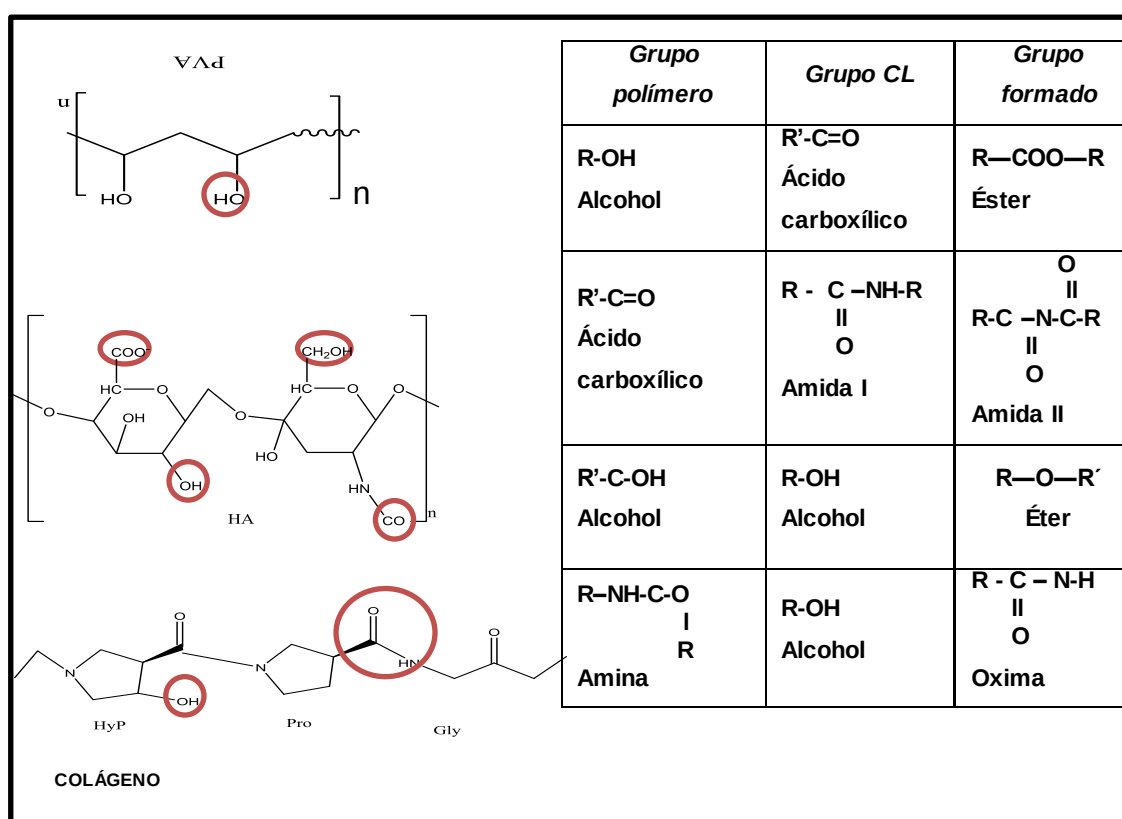


Figura 37 Esquema representativo del compuesto colágeno-PVA-HA.

Estas fibras fueron obtenidas mediante la preparación de una mezcla de colágeno 3.2% (peso/volumen) 1,1,1,3,3, hexafluoro-isopropanol, PVA 8% en agua (peso volumen) y HA 0.5% en agua (peso/volumen) en proporción 25:37.5:37.5 (colágeno:PVA:SC); lo que equivale a 0.32 gr de colágeno, 1.2 gr de PVA y 0.075 gr de HA por cada 40 mL de solución total, mediante electrohilado bajo las

condiciones mostradas en Tabla 15 mostrada anteriormente, las estructura
resultante del proceso de electrohilado se muestra en la Figura 38.

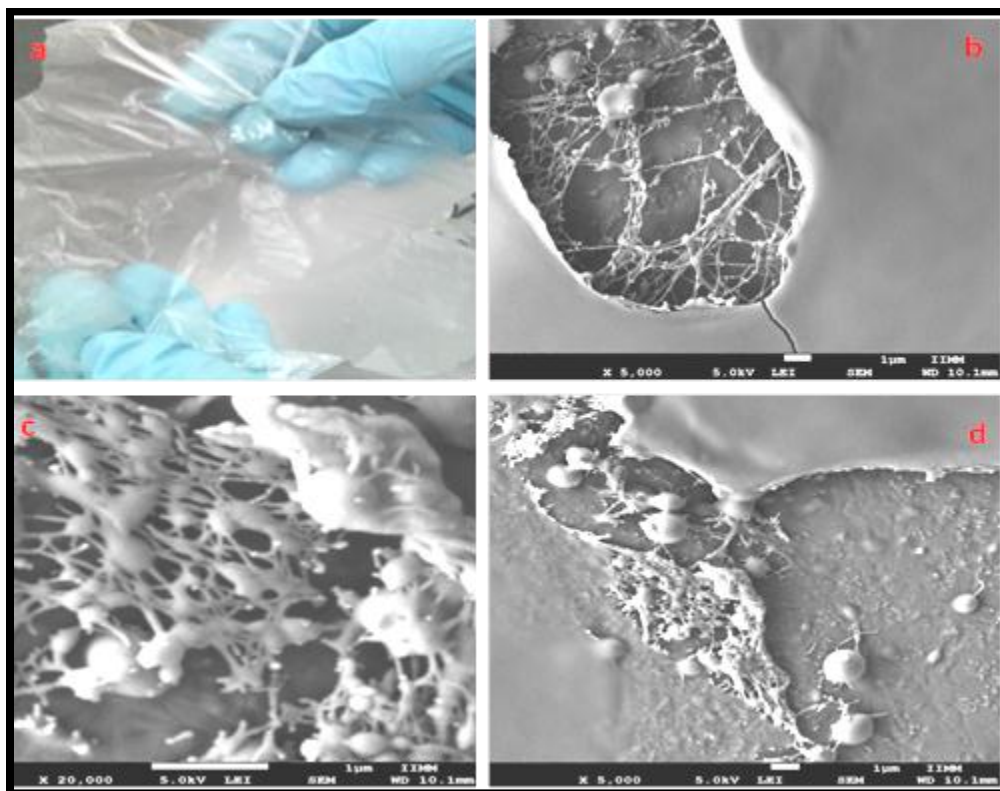


Figura 38 Fotografía (a) e imágenes SEM a diferentes magnificaciones (b, c, d) de la fibra colágeno-PVA-HA.

En la Figura 39 se presenta un espectro de infrarrojo de las nanofibras de colágeno-PVA-HA (d) comparado con el espectro de sus componentes individuales colágeno (a), PVA (b) y HA (c). En la parte superior de la Figura se presenta un acercamiento del área de entre 2000 y 700 cm^{-1} con la finalidad de determinar con mayor claridad los cambios vibracionales en el compuesto resultante de la combinación respecto de cada uno de sus componentes individuales.

Nuevamente debido a la cercanía existente entre las posiciones de las bandas de vibracionales de los grupos funcionales de los polímeros, es difícil asignar las bandas en los espectros. Sin embargo, es posible observar de manera general lo siguiente:

- 1316 ❖ Se disminuye la intensidad en las bandas en 3290 cm^{-1} del colágeno
1317 y del PVA, y en 3330 cm^{-1} del HA, pero a una proporción menos que
1318 cuando la combinación de dos componentes como en el caso de
1319 colágeno-PVA y colágeno-HA.
1320
- 1321 ❖ Desaparece la banda en 2877 cm^{-1} correspondiente al movimiento
1322 vibracional del grupo C-H de la cadena polimérica.
1323
- 1324 ❖ Desaparece por completo la bandas en 1378 cm^{-1} , 1270 cm^{-1} , 1212
1325 cm^{-1} , 1179 cm^{-1} , 1099 cm^{-1} , 890 cm^{-1} y 830 cm^{-1} , todas ellas
1326 relacionadas con vibraciones de los enlaces C=O, C-H, C-N, C-O y
1327 N-O del colágeno.
1328
- 1329 ❖ Hay un corrimiento de la banda en 2930 cm^{-1} del colágeno a 2924
1330 cm^{-1} correspondiente al movimiento del grupo C-H.
1331
- 1332 ❖ Desaparecen las bandas 2940 y 2907 cm^{-1} del PVA indicativos de las
1333 interacciones y vibraciones de los grupos C-H de la cadena
1334 polimérica y de alcoholes primarios R-OH.
1335
- 1336 ❖ Corrimiento de la banda de 1605 cm^{-1} correspondiente al movimiento
1337 de tensión del C-O del HA a 1628 cm^{-1} .
1338
- 1339 Considerando el análisis infrarrojo podemos proponer que la interacción
1340 entre el colágeno, el PVA y el HA se da de igual forma por medio de diferentes
1341 rutas como se menciona a continuación:
- 1342 ✓ Formación de esteres por la reacción de ácidos carboxílicos del HA y
1343 alcoholes del colágeno, las cuales son detectadas en 1037 cm^{-1} del
1344 espectro de la combinación colágeno-PVA-HA.

- 1345 ✓ Interacción de ácidos carboxílicos del HA y grupos NH del colágeno,
 1346 OH del PVA y los grupos NH y NH₂ del colágeno para formar oximas
 1347 RR'C=NOH y amidas las cuales son detectadas en 1628 y 1544 cm⁻¹.
 1348 1.
 1349 ✓ La interacción entre los grupos OH del PVA y los grupos C=O del
 1350 colágeno para formar éteres, los cuales se detectan en 1037 y 1148
 1351 cm⁻¹.
 1352 ✓ La interacción entre los grupos, los cuales se detectan en 1420 cm⁻¹
 1353 y 1636 cm⁻¹.
 1354

1355 En la Figura 40 se presenta la imagen del análisis mediante DSC del
 1356 compuesto CL/PVA-HA, en la cual se muestra el flujo de calor como función de la
 1357 temperatura y una respuesta endotérmica al estar orientada hacia abajo. Se
 1358 determinó el valor de T_g en las curvas DSC por el punto de la curva térmica
 1359 correspondiente a 1/2 de la diferencia de flujo de calor entre la temperatura de
 1360 comienzo extrapolada (T₁) y la temperatura de retorno a la línea de base (T₂) en la
 1361 curva de DSC.

1362 La Figura 40 presenta también dos ampliaciones en diferentes regiones, en
 1363 la región I se presenta de 20° C a 100° C para mostrar el cálculo de la T_g =42.7° C
 1364 y en la región II se muestra de 130° C a 170° C donde se pueden observar las
 1365 temperaturas de cristalización T_c= 140° C y fusión T_f=161° C del material.

1366 Adicional a estos picos mencionados se presentan tres endotérmicos más,
 1367 a 222° C, 251° C y 290° C, los cuales corresponden a las temperaturas de
 1368 descomposición del colágeno, ácido hialurónico y PVA respectivamente. .

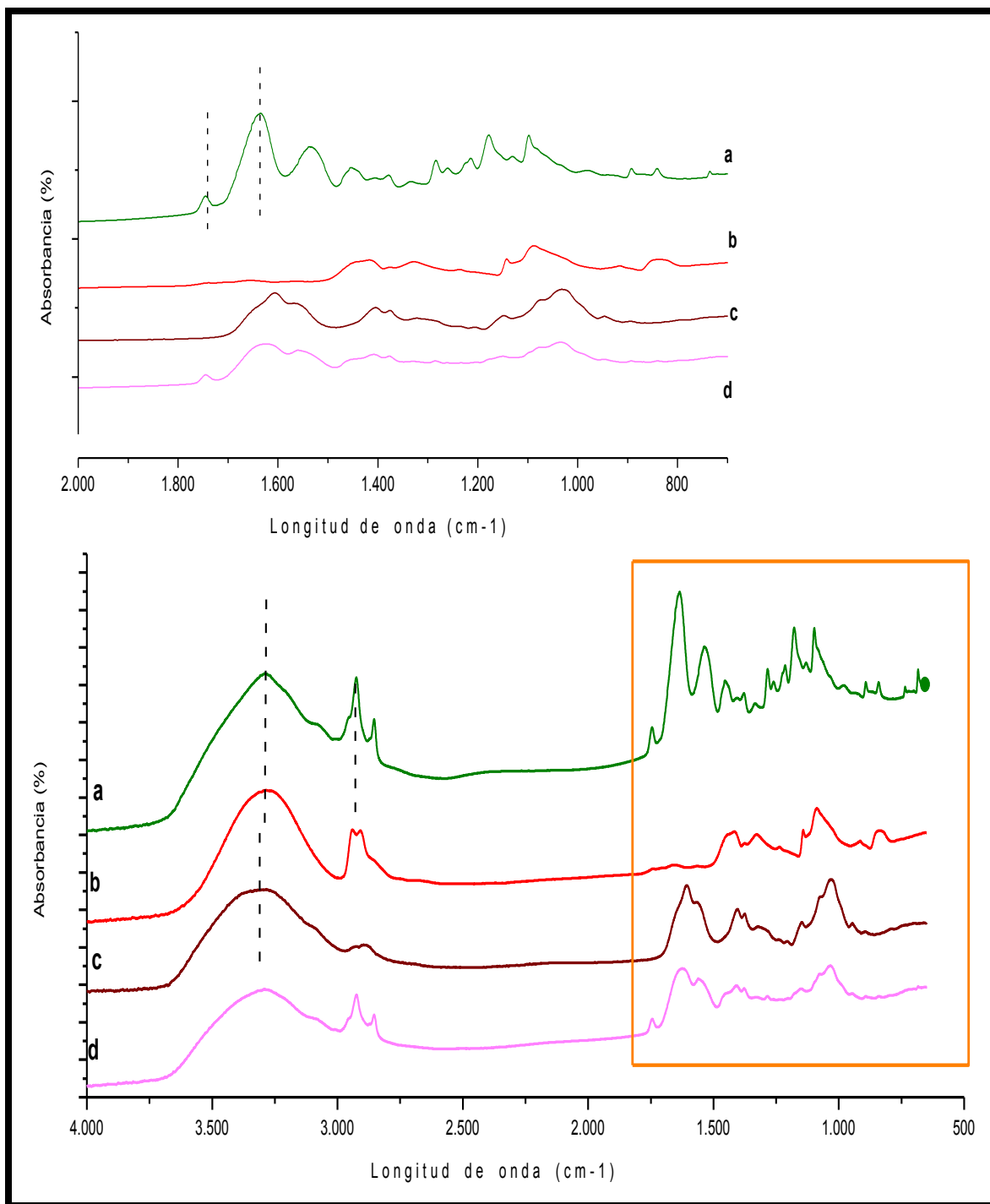


Figura 39 Espectro de infrarrojo para colágeno puro (a), PVA (b) puro, (HA) puro (c) y el compuesto colágeno-PVA-HA (d).

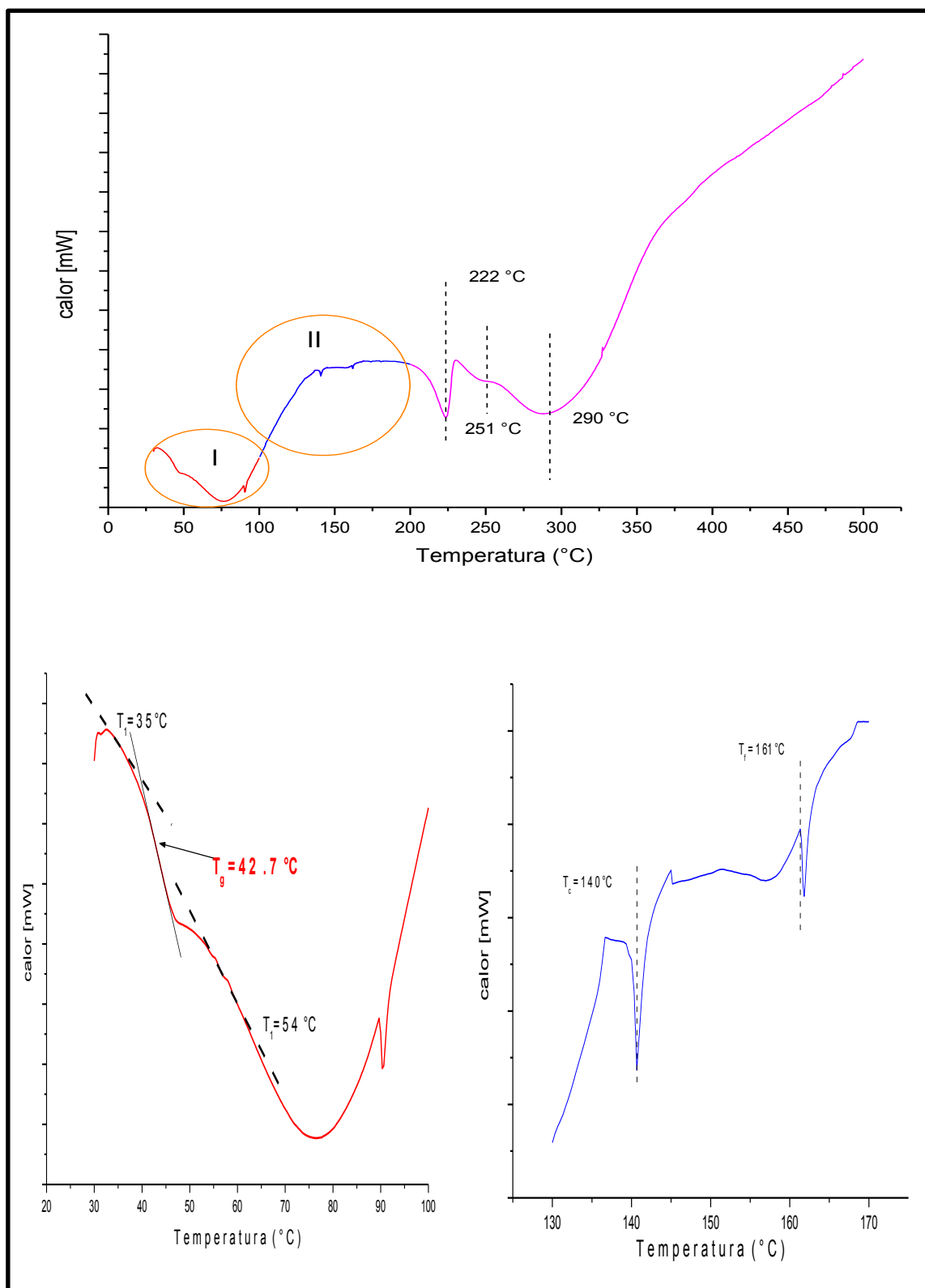


Figura 40 Análisis DSC del compuesto colágeno/PVA-HA.

3.3.2.6 Nanofibras Colágeno/SC-HA

En la Figura 41 se presenta esquemáticamente la molécula de colágeno y las cadenas poliméricas de SC y HA, identificando los grupos funcionales que posiblemente interactúan al formar el compuesto colágeno-SC-HA. El sulfato de condroitina contiene grupos funcionales [OH], [C=O], [NH], [SO₃] y [C-O], mientras que el ácido hialurónico posee grupos funcionales [OH], [C=O], [NH] y [C-O] que son los pueden interactúan con el colágeno, del cual se muestra una sección formada por glicina, prolina e hidroxiprolina con radicales [NH], [N], [C=O] y [OH].

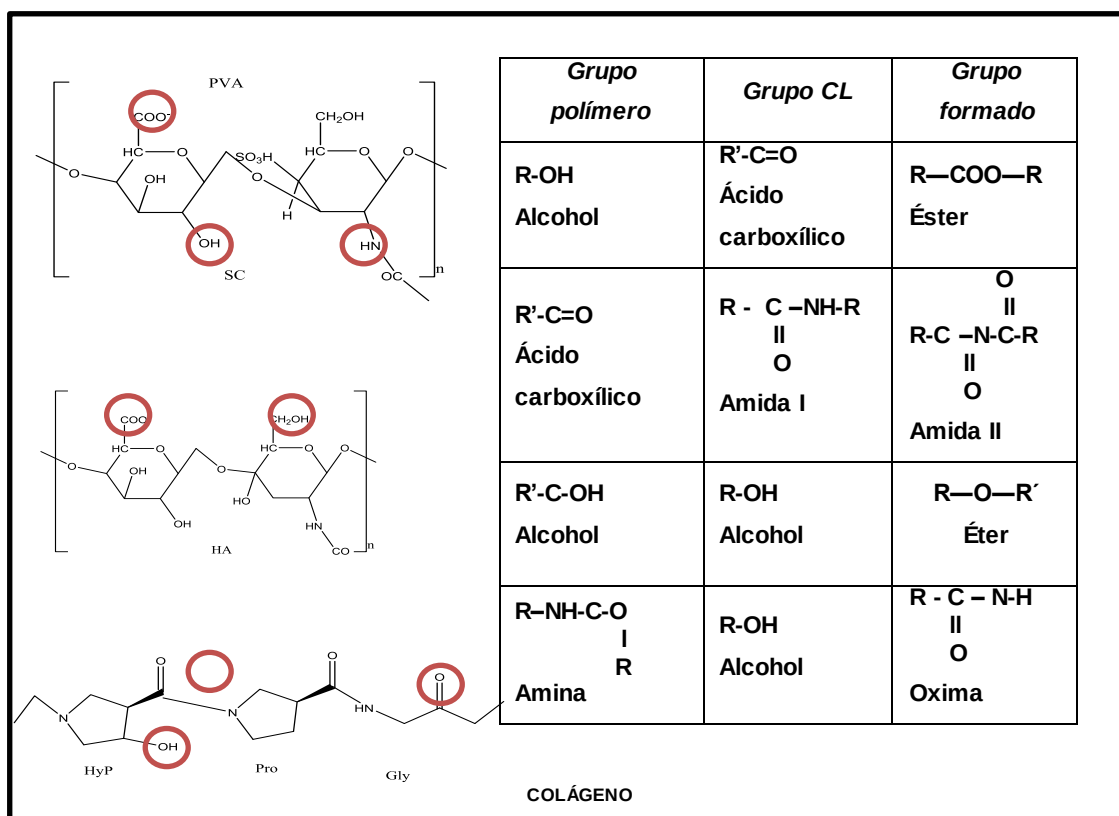


Figura 41 Esquema representativo del compuesto colágeno-SC-HA.

En la Figura 42 se muestran las nanofibras a partir de esta combinación. Estas fibras fueron obtenidas mediante la preparación de una mezcla de colágeno 3.2% (peso/volumen) 1,1,1,3,3, Hexafluoro-isopropanol, sulfato de condroitina en agua 2.5% (peso/volumen) y ácido hialurónico 0.5% en agua (peso/volumen) en proporción 25:37.5:37.5 (colágeno:PVA:SC); lo que equivale a 0.32 gr de

colágeno, 0.375 gr de SC y 0.075 gr de HA por cada 40 mL de solución, solución electrohilada bajo las condiciones de operación mencionadas en la Tabla 15.

En la Figura 42 (a) se presenta una fotografía de la colección de nanofibras obtenida del proceso de electrohilado, se presenta en forma de película blanca, transparente y de textura lisa. Asimismo, la Figura 42 (b) presenta una imagen SEM donde se observa una superficie lisa, mientras que en las imágenes (c), (d) y (e) se observa la misma muestra a mayor magnificación, se observa una capa lisa cubriendo la superficie de las fibras, lo que sugiere una separación de fases. En este caso, aun cuando se observan indicios de formación de nanofibras, no se logró un electrohilado adecuado y de calidad. Estas imágenes presentan evidencia de que el jet no se formó adecuadamente.

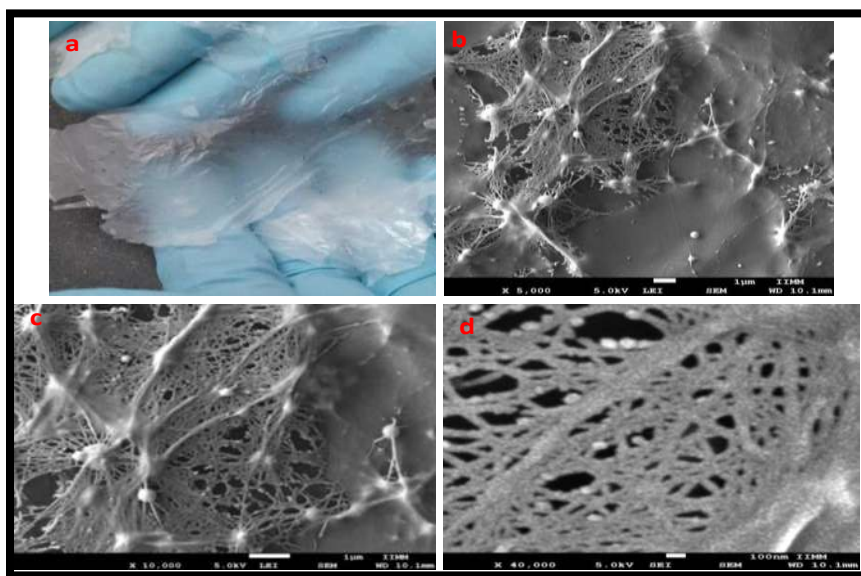


Figura 42 Fotografía (a) e imágenes SEM a diferentes magnificaciones (b, c, d) de la fibra colágeno-SC-HA.

En la Figura 43 se presenta un espectro de infrarrojo de las nanofibras de colágeno-SC-HA (c) comparado con el espectro de sus componentes individuales colágeno (a), SC (b) y HA (c). En la parte superior de la Figura se presenta un acercamiento en la región de 2000 a 700 cm^{-1} con la finalidad de determinar con mayor claridad los cambios vibracionales en el compuesto resultante de la combinación respecto de cada uno de sus componentes individuales.

Nuevamente, debido a la cercanía de las bandas en los componentes individuales se hace difícil determinar un cambio extra a la disminución de la absorbancia o ensanchamiento de los picos atribuible a la interacción entre los grupos funcionales del colágeno, SC y HA al adicionarse.

Los principales cambios en los espectros IR, son similares a los que ocurren cuando se tienen la combinación de dos componentes, como son colágeno-SC y colágeno HA de manera separada y se mencionan a continuación:

- ❖ Se disminuye la intensidad de las bandas en 3290 cm^{-1} del colágeno, en 3330 cm^{-1} del HA y en 3340 cm^{-1} del SC, lo cual hace suponer que existe interacción entre los grupos amino e hidroxilo del colágeno con los grupos hidroxilo del CS y del HA.
- ❖ Desaparecen los picos de absorción en 2890 cm^{-1} del SC y en 2877 cm^{-1} del HA correspondientes a los enlaces C-H.
- ❖ Desaparece por completo las bandas en 1378 cm^{-1} , 1270 cm^{-1} , 1212 cm^{-1} , 1179 cm^{-1} , 1099 cm^{-1} , 890 cm^{-1} y 830 cm^{-1} , todas ellas relacionadas con vibraciones de los enlaces C=O, C-H, C-N, C-O y N-O del colágeno.
- ❖ Hay un corrimiento de la banda en 1640 cm^{-1} del colágeno hacia 1626 cm^{-1} , esta señal corresponde a vibraciones de enlaces C-O, C-N y N-H del colágeno.
- ❖ Se observa un corrimiento de la banda en 1029 cm^{-1} del SC correspondiente a los movimientos del enlace C-O.
- ❖ Hay un corrimiento de la banda en 2930 cm^{-1} del colágeno hacia 2924 cm^{-1} , la cual corresponde vibraciones del enlace C-H.

1475 ❖ Considerando el análisis infrarrojo es posible proponer que la
1476 interacción entre el colágeno y el SC se presenta por medio de
1477 diferentes rutas:

1478
1479 ✓ Formación de esteres por la reacción de ácidos carboxílicos del SC y
1480 del HA, con los grupos OH y amino del colágeno, las cuales son
1481 detectadas en 1037 cm^{-1} del espectro de la combinación colágeno-
1482 SC-HA.

1483 ✓ Formación de amidas y oximas por la reacción de ácidos carboxílicos
1484 del SC y del HA con los grupos NH del colágeno, las cuales son
1485 detectadas en 1626 cm^{-1} .

1486 En la Figura 44 se presenta la imagen del estudio DSC del compuesto
1487 CL/PVA-HA, en la cual se muestra el flujo de calor como función de la temperatura
1488 de la muestra y una respuesta endotérmica pues está orientada hacia abajo. Se
1489 determinó el valor de T_g en las curvas DSC por el punto de la curva térmica
1490 correspondiente a 1/2 de la diferencia de flujo de calor entre la temperatura de
1491 comienzo extrapolada (T_1) y la temperatura de retorno a la línea de base (T_2) en la
1492 curva de DSC.

1493 La Figura 44 presenta también con una ampliación de 30° C a 250° C para
1494 mostrar el cálculo de la $T_g = 115^\circ\text{ C}$, y donde se pueden observar las temperaturas
1495 de cristalización $T_c = 215^\circ\text{ C}$ y fusión $T_f = 242^\circ\text{ C}$ del material.

1496 Adicional a estos picos mencionados se presentan tres endotérmicos más,
1497 a 246° C , 258° C y 291° C , los cuales se atribuyen a la degradación térmica de
1498 cada uno de los componentes de la mezcla.

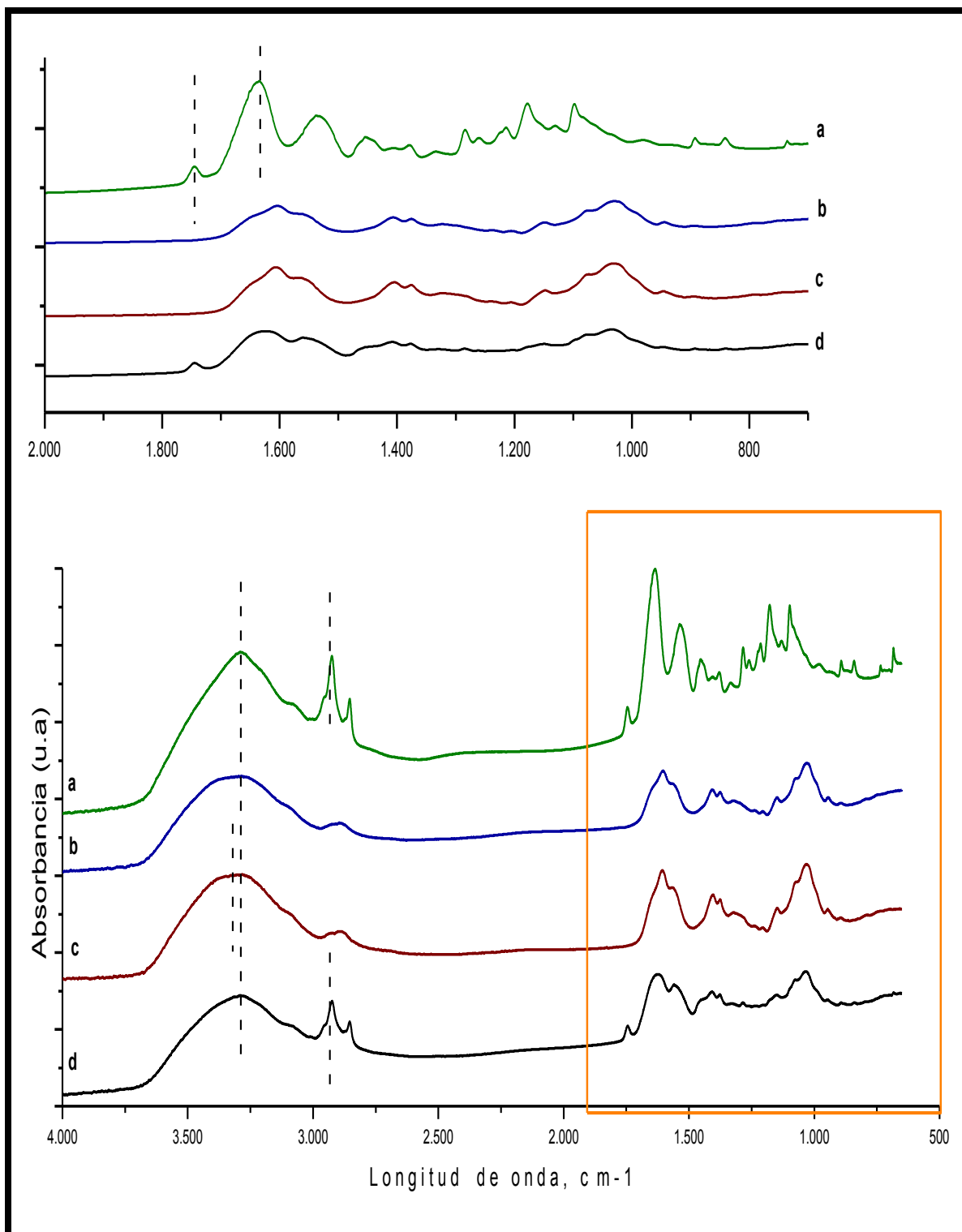


Figura 43. Espectro de infrarrojo para colágeno puro (a), Sulfato de condroitina, (SC) puro (b), (HA) puro (c) y el compuesto colágeno-SC-HA (d).

1503

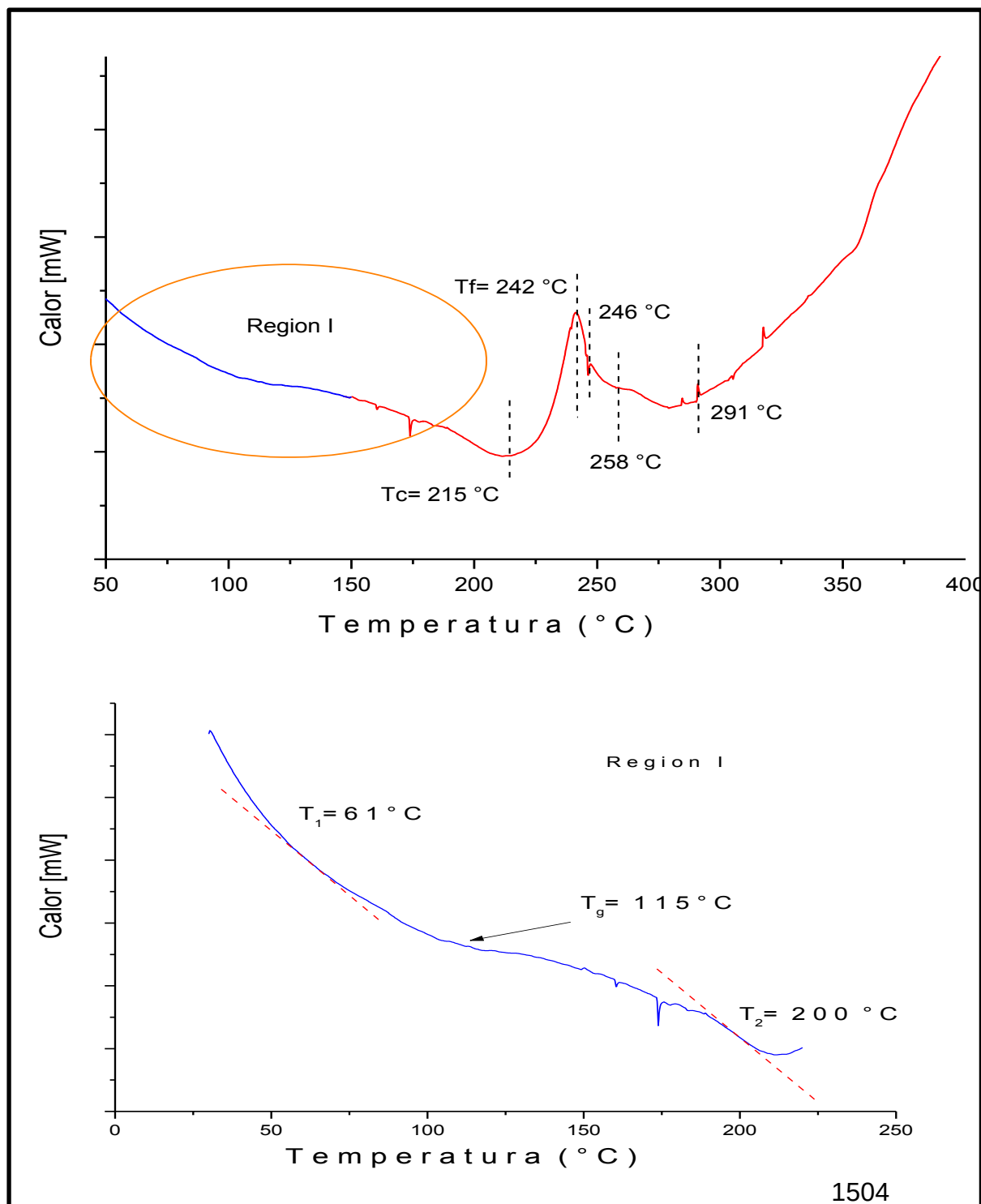


Figura 44 Análisis DSC para compuesto colágeno-SC-HA.

1507

3.3.2.7 Nanofibras Colágeno/PVA-SC-HA

En la Figura se muestra la molécula del colágeno y las cadenas poliméricas de PVA, SC y HA en donde se indican los grupos funcionales que posiblemente interactúan al formar el compuesto colágeno-PVA-SC-HA. El alcohol polivinílico contiene grupos [OH], el sulfato de condroitina posee grupos funcionales [OH], [C=O], [NH], [SO₃] y [C-O], mientras el ácido hialurónico contiene grupos [OH], [C=O], [NH] y [C-O] todos ellos con posibilidades de interaccionar con los grupos funcionales del colágeno el cual contiene una sección formada por glicina, prolina e hidroxiprolina con grupos [NH], [N], [C=O] y [OH] altamente reactivos.

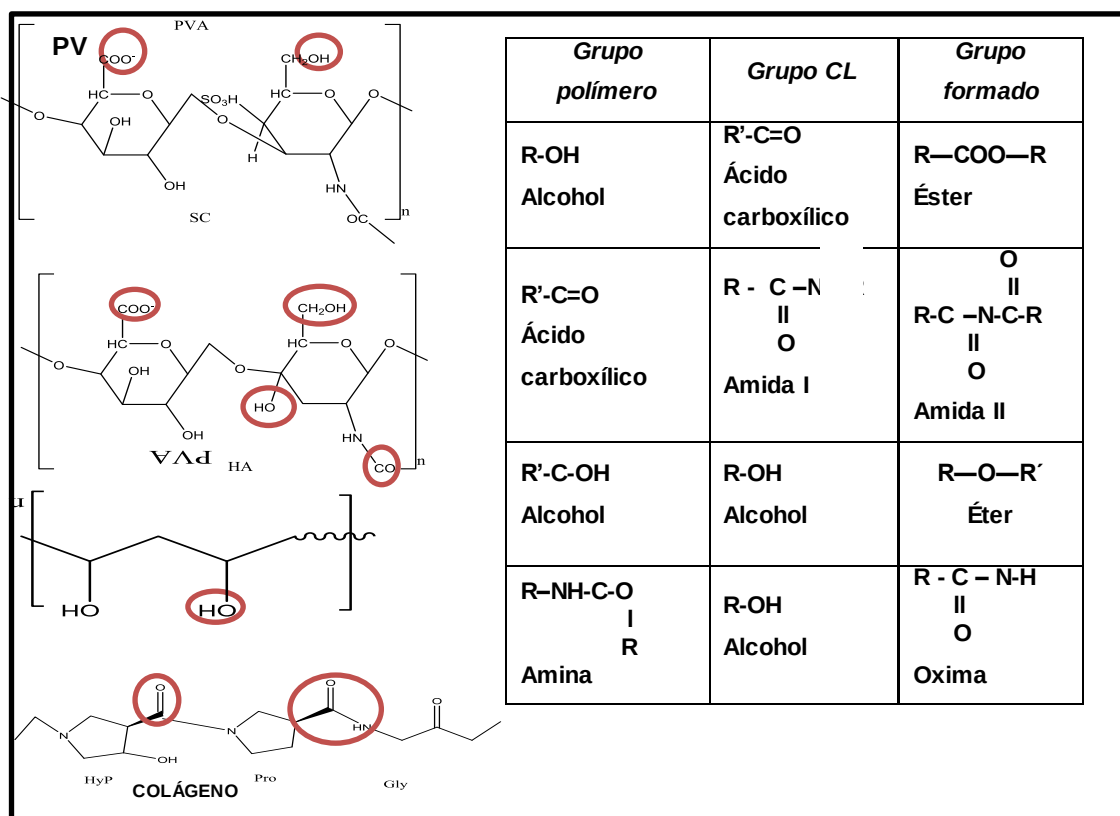


Figura 45 Esquema representativo del compuesto colágeno-PVA-SC-HA.

En la Figura 46 (a) se muestra la colección de nanofibras resultante esta combinación. El proceso de electrohilado se llevó a cabo bajo las condiciones enlistadas en Tabla 15. Se observa una película transparente y de textura lisa. Esta película fue obtenida mediante la preparación de una mezcla de colágeno

3.2% (peso/volumen) 1,1,1,3,3, Hexafluoro-isopropanol, sulfato de condroitina en agua 2.5% (peso/volumen) y ácido hialurónico 0.5% en agua (peso/volumen) en proporción 19:27:27:27 (colágeno:PVA:HA:SC); lo que equivale a 0.32 gr de colágeno, 1.2 gr de PVA, 0.375 gr de SC y 0.075 gr de HA por cada 55 mL de solución.

En la Figura 46 (b) se observa una imagen SEM de la película, la cual tiene una superficie lisa con pequeños defectos en la superficie. A mayores magnificaciones (Figuras (c), (d) y (e)), se observa que la formación de las nanofibras en esta combinación de los cuatro componentes, bajo las condiciones descritas anteriormente, no fue posible obtener nanofibras. El aspecto que presenta esta combinación, sugiere una separación de fases, lo que muy posiblemente afecte de manera considerable la formación del jet, y por ende no es posible generar nanofibras.

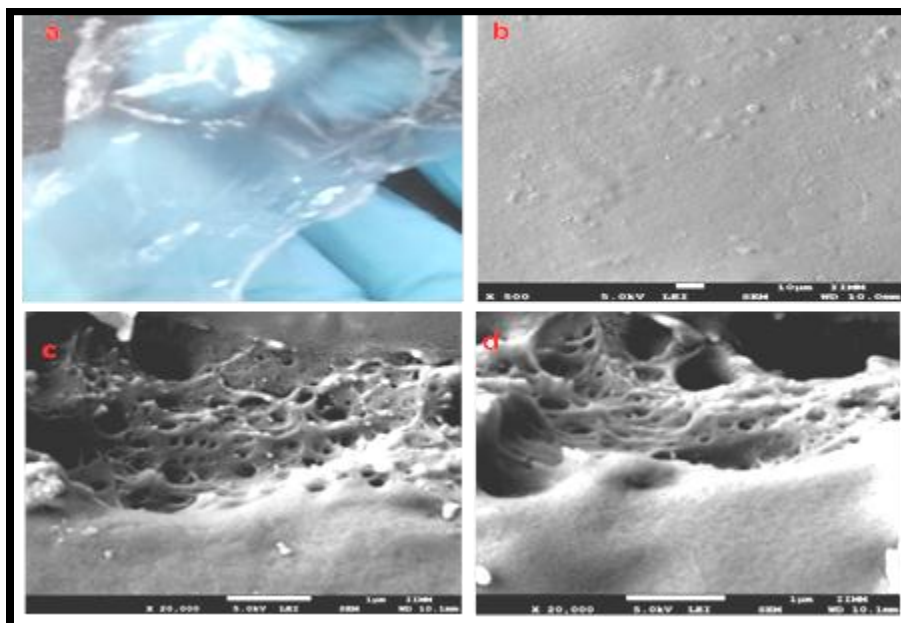


Figura 46 Fotografía (a) e imágenes SEM a diferentes magnificaciones (b, c, d) de la fibra colágeno-PVA-SC-HA.

La Figura 47 presenta un espectro de infrarrojo de las nanofibras de colágeno-PVA-SC-HA (c) comparado con el espectro de sus componentes individuales colágeno (a) y PVA (b), SC (c) y HA (d). En la parte superior de la Figura se presenta un acercamiento de la región comprendida entre 2000 y 700

cm con la finalidad de determinar con mayor claridad posibles cambios en el compuesto resultante de la combinación respecto de cada uno de sus componentes individuales.

En el espectro IR podemos ver las vibraciones características de cada uno de los componentes individuales discutidos anteriormente. De manera similar, los cambios que se presentan en esta combinación son atribuibles a la posible formación de amidas y ésteres debido a la interacción entre los grupos amino y OH del colágeno, con los grupos C=O y OH del SC y del HA y los OH del PVA, los cuales son detectados en 1636 cm^{-1} , 1434 cm^{-1} , 1049 cm^{-1} y 843 cm^{-1} .

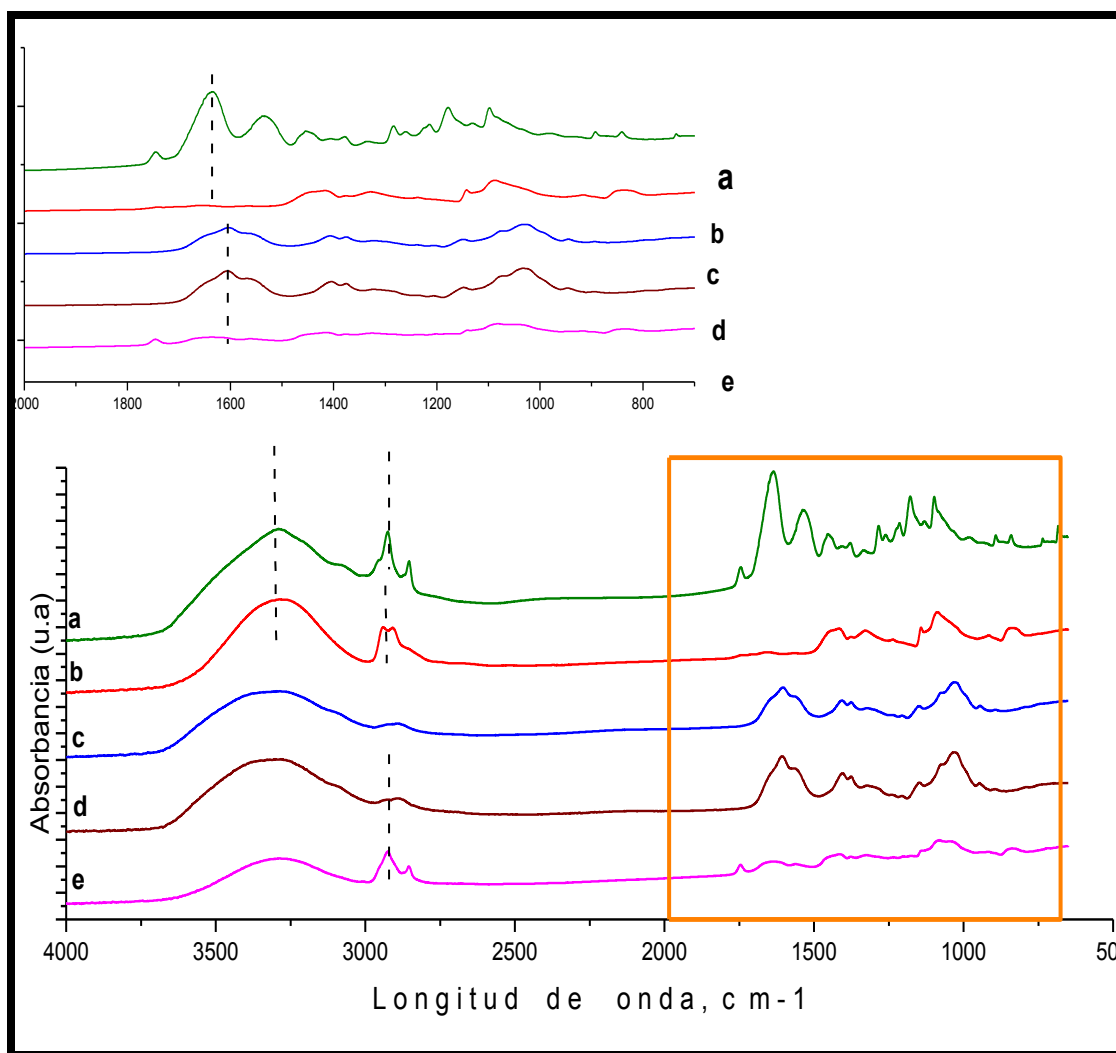


Figura 47 Espectro de infrarrojo para colágeno puro (a), PVA (b), (SC) puro (c), (HA) puro (d) y el compuesto colágeno-PVA-SC-HA (e).

3.4 Películas delgadas

El estudio de materiales compuestos de una matriz polimérica y nanotubos de carbono han tenido un gran énfasis en los últimos años debido a la necesidad de reforzar las propiedades mecánicas de nuevos materiales (86). Con la finalidad de analizar y estudiar este tipo de nano compuestos se prepararon combinaciones de colágeno-PVA-sulfato de condroitina-NTC (CL-PVA-SC-NTC) y colágeno-PVA-ácido hialurónico-NTC (CL-PVA-HA-NTC) en forma de películas delgadas por la técnica de evaporación de solvente.

3.4.1 Materiales y Equipos para síntesis de películas delgadas.

En la Tabla 19 se muestran los materiales y equipos utilizados para la síntesis de películas delgadas de cada una de las combinaciones. Se obtuvieron películas delgadas del polímero colágeno tipo II, PVA, sulfato de condroitina y ácido hialurónico y fueron reforzadas con nanotubos de carbono de pared múltiple por la técnica de evaporación de solvente.

Tabla 19 Materiales y equipos utilizados en la síntesis de películas delgadas.

Material	Equipos
Colágeno tipo II (Sigma)	Parrilla eléctrica de agitación (Thermo Scientific, modelo SP131325)
Ácido hialurónico (Sigma)	Ultrasonido, marca Fisher Scientific, modelo FS30D.
Alcohol polivinílico (Sigma)	Estufa de secado
Sulfato de condroitina (Sigma)	
1 1 1 3 3 3-hexafluoro-2-propanol (99% sigma)	

Para formar las películas se disolvieron los polímeros mediante agitación mecánica en el solvente adecuado de acuerdo a lo indicado en la Tabla 13. Posteriormente se agregaron los NTC manteniendo la agitación el tiempo necesario para su dispersión. Posteriormente, la mezcla se vertió en cajas Petri de plástico de 10 cm de diámetro, se llevaron a la estufa a 60°C durante 24 horas para evaporar el solvente. Las películas resultantes se conservaron en las cajas Petri para su posterior uso y caracterización.

3.4.2 Películas delgadas de Colágeno/PVA-SC-NTC

En la Figura 48 se presenta el esquema representativo de la molécula de colágeno y del sulfato de condroitina interaccionando con los nanotubos de carbono de pared múltiple en donde se indica los grupos potenciales con potencial de interacción para la formación del compuesto colágeno-PVA-SC-NTC.

Esta combinación fue obtenida mediante la preparación de una mezcla de colágeno 3.2% (peso/volumen) 1,1,1,3,3, hexafluoro-isopropanol y PVA (preparada anteriormente con proporción 40:60 respectivamente) y sulfato de condroitina 2.5% en agua (peso/volumen), con nanotubos de carbono dispersos en agua 0.01% (peso/volumen), en proporción 40:40:20 (colágeno-PVA:SC:NTC) ; lo que equivale a 0.32 gr de colágeno, 0.375 gr de SC y 0.015 gr de NTC por cada 40 mL de solución. Se prepararon películas delgadas en cajas Petri mediante evaporación de solvente de esta combinación para la caracterización IR.

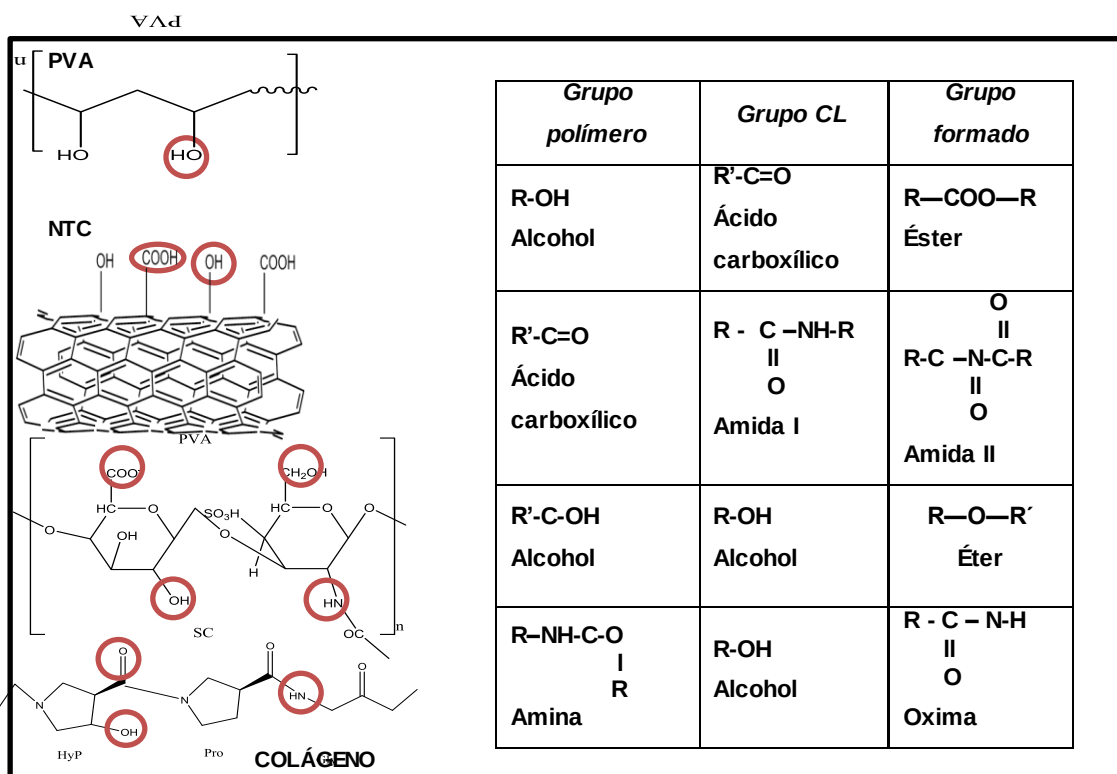


Figura 48 Esquema representativo del compuesto colágeno-PVA-SC-NTC.

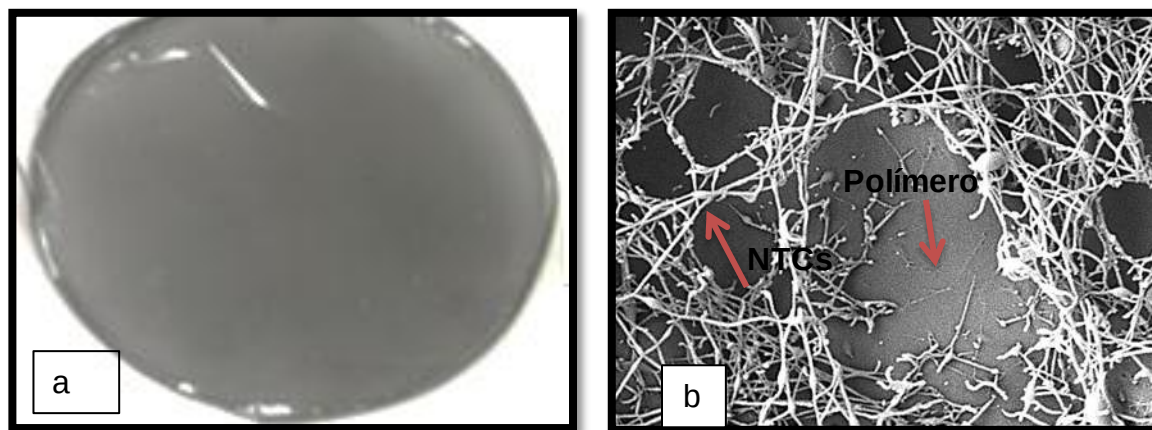


Figura 49 Imagen a) fotográfica y b) SEM del compuesto colágeno-PVA-SC-NTC.

La Figura 49a muestra una imagen de la película obtenida a partir de esta combinación, macroscópicamente, los NTC proveen una tonalidad de gris oscuro a la película. En la imagen 49 b) se muestra una imagen SEM de esta muestra CL/PVA-SC-NTC, en la cual se observa que los NTC se encuentran disipados a lo largo de la matriz polimérica. Por su parte, los espectro IR de esta combinación, muestran las vibraciones características de los grupos funcionales de los componentes individuales, ya discutidos anteriormente, lo cual se observa en la Figura 50. De acuerdo a los espectros IR de colágeno, SC y NTC, algunas posiciones de sus vibraciones características son muy cercanas, como resultado es difícil atribuir bandas en los espectros de las mezclas a los grupos funcionales del colágeno o del SC. Sin embargo se revelan pequeños cambios en los espectros como resultado de la variación de los coeficientes de colágeno-SC-NTC.

Por su parte, en el espectro de los NTC se detectan señales en 1638 y 1331 cm^{-1} que corresponden a los estiramientos simétricos del enlaces C=O y del O-H del grupo carboxílico respectivamente, y en 3321 cm^{-1} que corresponde al estiramiento simétrico del grupo-OH. La presencia de estos grupos funcionales en la superficie sobre los NTC permite lograr una alta dispersión de estos en agua, lo cual es esencial para su combinación en solución otros componentes.

Considerando el análisis infrarrojo es posible proponer que la interacción entre el colágeno y el SC se da por medio de diferentes rutas como se menciona a continuación:

- ✓ Formación de esteres por la reacción de ácidos carboxílicos del SC y NTC con los OH del colágeno las cuales son detectadas en 1052 y 1149 cm^{-1} del espectro de la combinación colágeno-SC.
- ✓ Formación de amidas y oximas por la reacción de ácidos carboxílicos del SC y NTC con los grupos NH del colágeno, las cuales son detectadas en 1631 y 1545 cm^{-1} .
- ✓ La banda en 3304 cm^{-1} indica vibraciones de los grupos OH y NH del colágeno y del CS y de los OH del CS y los NTC.

El análisis DSC mostrado en la Figura 51, indica una temperatura de transición vítrea, T_g de este compuesto de aproximadamente 197° C, una temperatura de cristalización de 221° C y de fusión 223° C. Se observan picos exotérmicos a 235° C y 259° C y un endotérmico adicional a 289° C, los cuales indican la degradación de colágeno, sulfato de condroitina y PVA respectivamente. En la Figura 22, se determinó que los NTC comienzan a descomponerse a una temperatura aproximada de 650° C.

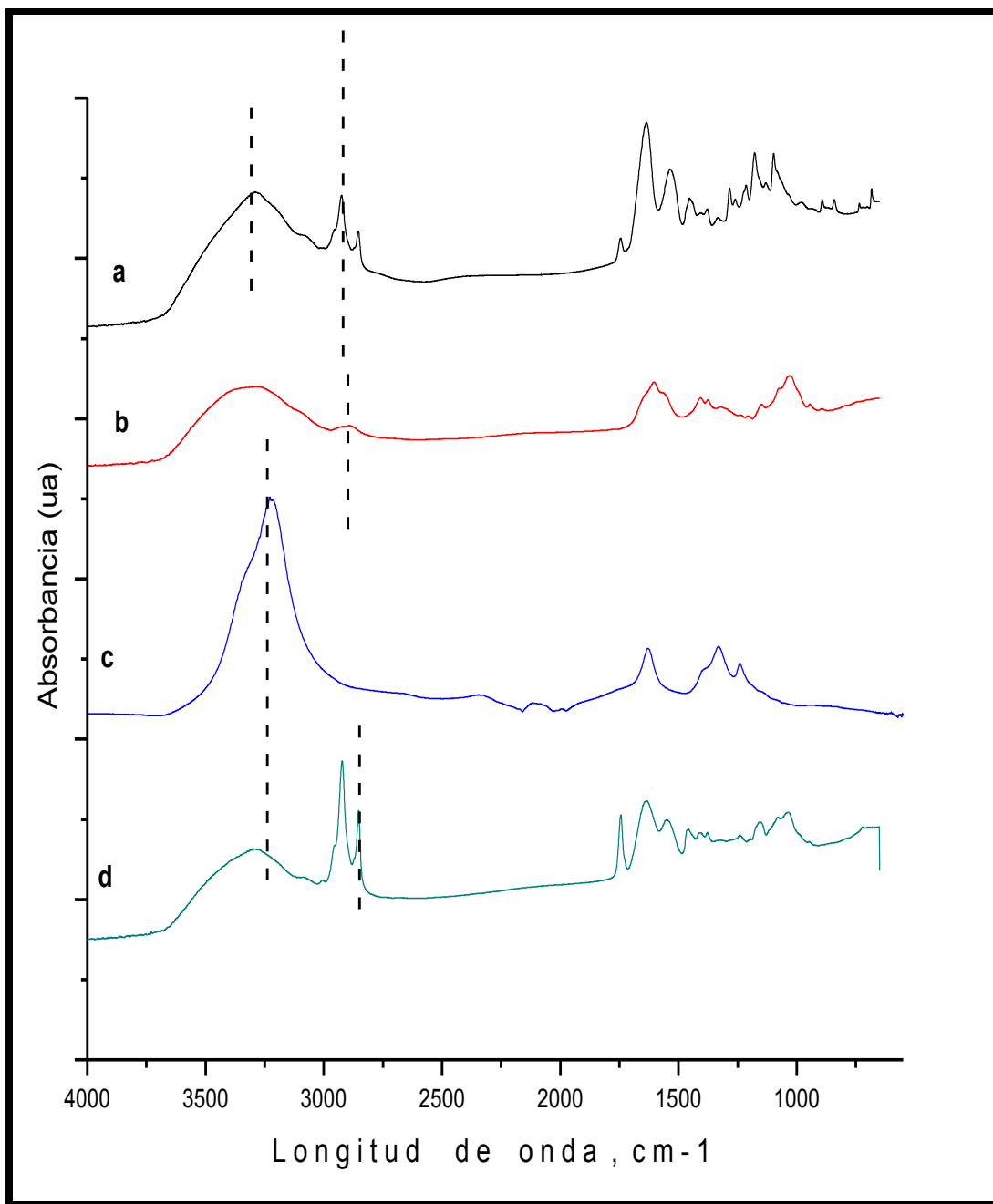


Figura 50 Espectro de infrarrojo para colágeno puro (a), (SC) puro (b), (NTC) puro (c) y el compuesto colágeno-SC-NTC (d).

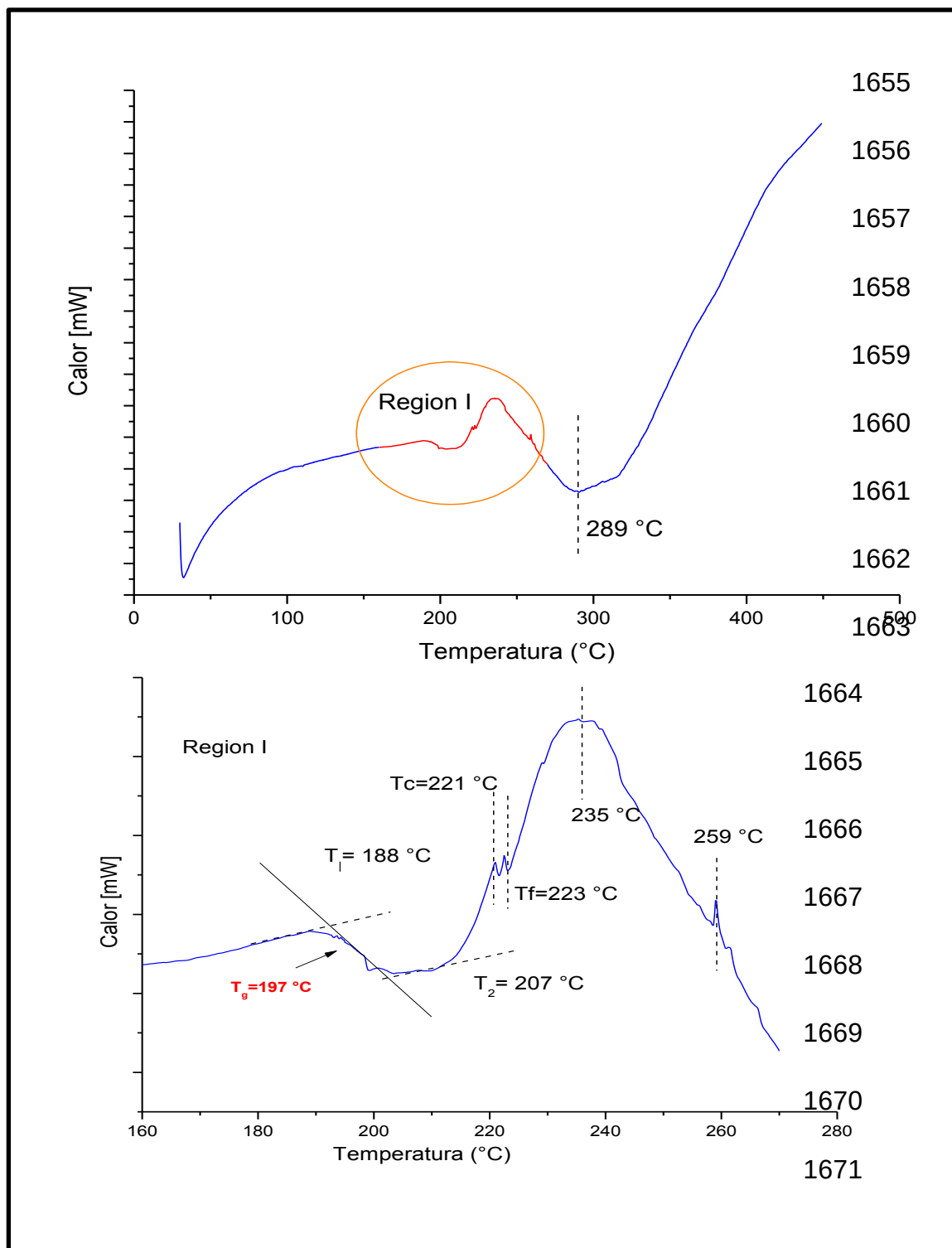


Figura 51 Análisis DSC del compuesto colágeno/PVA-SC-NTC.

3.4.3 Películas delgadas de Colágeno/PVA-SC-HA-NTC

En la Figura 52 se presenta el esquema representativo de la molécula proteica de colágeno y la cadena polimérica del sulfato de condroitina interaccionando con los nanotubos de carbono de pared múltiple mostrando los grupos funcionales que posiblemente interactúan al formar el compuesto colágeno-SC-NTC.

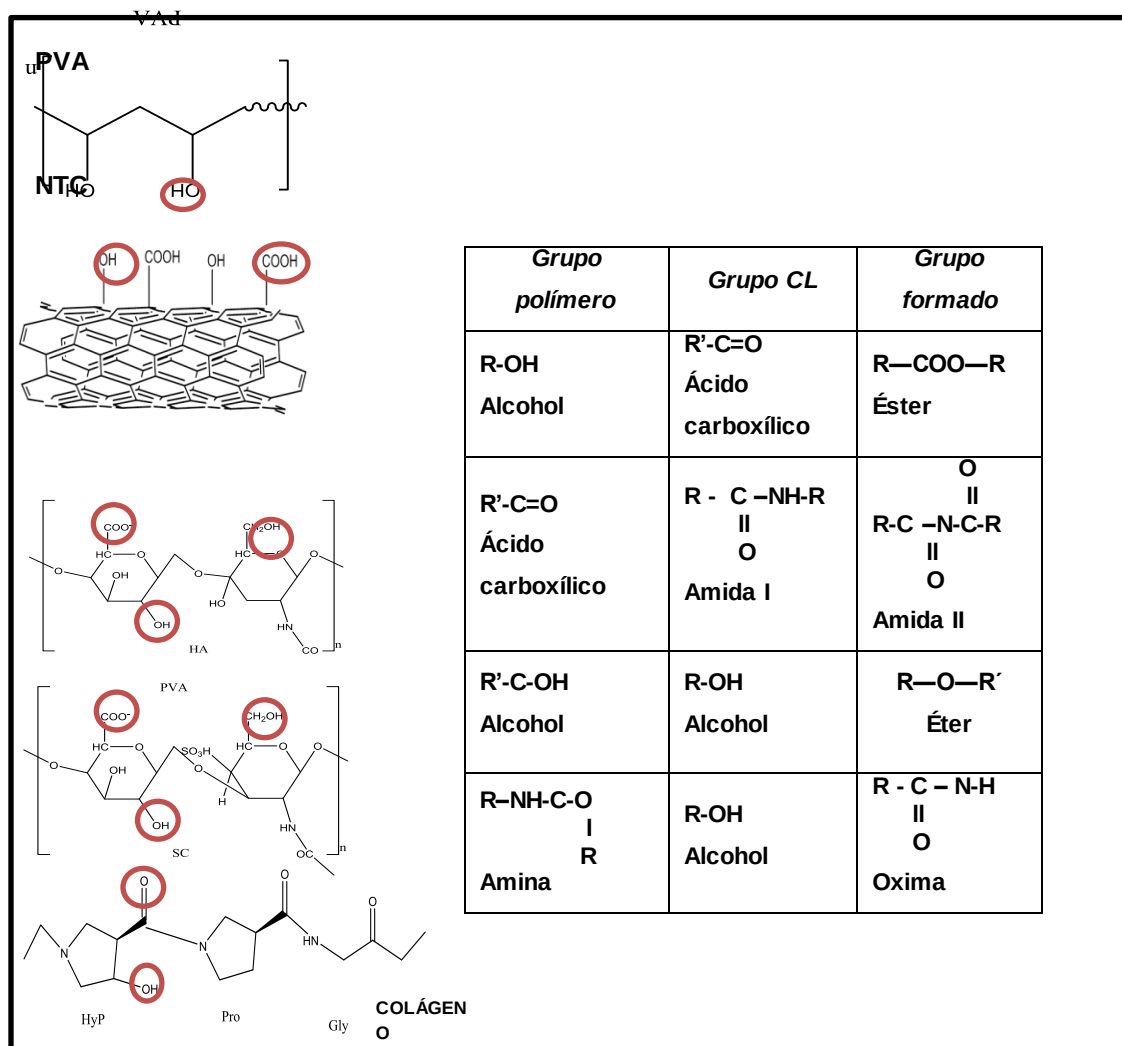


Figura 52 Esquema representativo del compuesto colágeno-PVA-SC-HA—NTC.

La formación de esta combinación fue obtenida mediante la preparación de una mezcla de colágeno 3.2% (peso/volumen) 1,1,1,3,3, hexafluoro-isopropanol,

sulfato de condroitina 2.5% en agua (peso/volumen) y ácido hialurónico 0.5 % (peso/volumen), con nanotubos de carbono dispersos en agua 0.01% (peso/volumen), en proporción 19:27:27:27 (colágeno:SC:HA:NTC); lo que equivale a 0.32 gr de colágeno, 0.375 gr de SC, 0.075 gr de HA y 0.015 gr de NTC por cada 55 mL de solución. Se prepararon películas delgadas mediante evaporación de solvente de esta combinación para la caracterización IR.

La Figura 53 muestra una fotografía de las películas obtenidas. La imagen SEM de la Figura 53a representa la combinación de CL/PVA-SC-HA-NTC en la cual la dispersión de los NTC en la matriz polimérica origina una coloración gris oscuro.



Figura 53 Fotografía del compuesto colágeno-PVA-SC-NTC

En los espectros de infrarrojo mostrados en la Figura 53, se observan claramente las vibraciones características de los grupos funcionales de los componentes individuales. La cercanía de las vibraciones características del colágeno, el PVA, el SC, el HA y los NTC, dificulta la asignación de las vibraciones en el espectro de la mezcla, sin embargo, se observan pequeños cambios en los espectros como resultado de la variación de los coeficientes de colágeno-SC-NTC.

En el espectro de los NTC se detectan señales en 1638 y 1331 cm^{-1} que corresponden a los estiramientos simétricos de los enlaces C=O y del O-H del grupo carboxílico respectivamente, y en 3321 cm^{-1} vibraciones correspondientes al estiramiento simétrico del grupo funcional -OH. La presencia de estos grupos

1723 funcionales en la superficie de los NTC permite lograr una alta dispersión en agua,
1724 lo cual es esencial para la combinación con otros componentes.

1725 Considerando el análisis infrarrojo es posible proponer que la interacción
1726 entre el colágeno y el SC se da mediante de diferentes rutas como se menciona a
1727 continuación:

1728 ✓ Formación de ésteres por la reacción de ácidos carboxílicos del SC,
1729 él HA y los NTC con los OH del colágeno, señales que son
1730 detectadas en 1045 y 1175 cm^{-1} del espectro de la combinación
1731 colágeno-SC.

1732 ✓ Formación de amidas y oximas por la reacción de ácidos carboxílicos
1733 del SC y NTC con los grupos NH del colágeno, las cuales son
1734 detectadas en 1660, 1763 y 1566 cm^{-1} .

1735 ✓ La banda en 3320 cm^{-1} indica movimientos vibracionales de los
1736 grupos OH y NH del colágeno, el CS y él HA, y los grupos OH de los
1737 NTC.

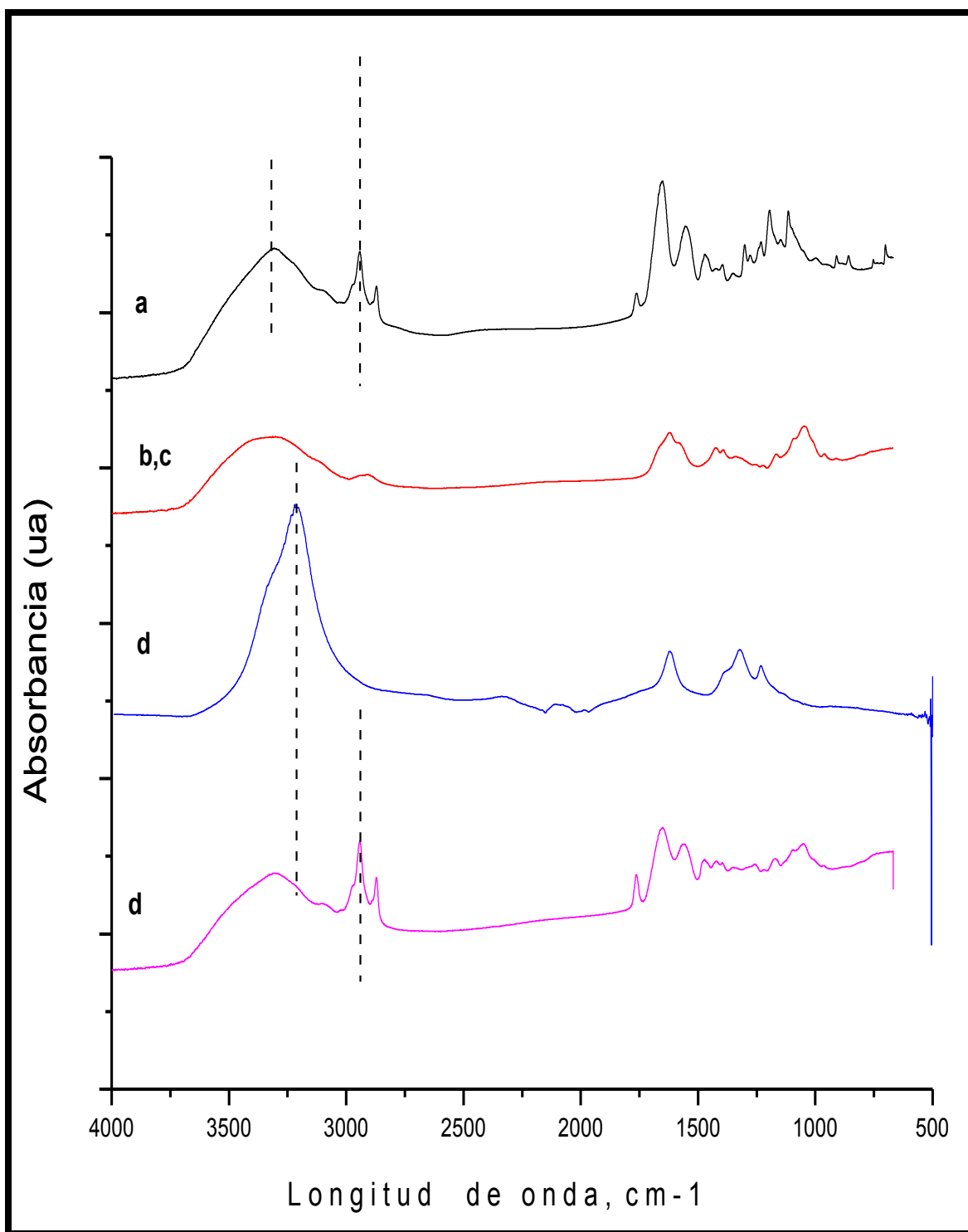


Figura 54 Espectro de infrarrojo para colágeno puro (a), (SC y HA) puro (b), (NTC) puro (c) y el compuesto colágeno-SC-NTC (d).

3.5 Evaluación del porcentaje de hinchamiento (%H) en los nanomateriales sintetizados

La evaluación del grado de hinchamiento permite determinar la capacidad de expansión o aumento de volumen de una muestra de los materiales obtenidos al ponerse en contacto con agua, lo cual está directamente relacionado con la capacidad de absorción de este componente. En la Tabla 21 se muestran los resultados obtenidos del grado de hinchamiento H en agua de cada uno de los materiales obtenidos, respecto al tiempo de exposición en segundos. La Figura 55 muestra los resultados gráficamente.

El experimento se llevó a cabo con una muestra con un peso inicial de 0.0034 gr aproximadamente, y poniéndola en contacto con 10 mL de agua destilada a 25 °C. El estudio se llevó a cabo midiendo la ganancia de peso del nanomaterial respecto del tiempo de inmersión. Este análisis termina en el tiempo t , una vez que la muestra no registre un cambio de peso. Cabe mencionar que los tiempos en los que se sumergió la muestra en el líquido fueron muy cortos debido a que una vez que han absorbido la máxima cantidad de agua algunos de ellos comienzan a disolverse completamente, principalmente aquellos que contienen una alta proporción de polímeros naturales como son el colágeno, el sulfato de condroitina y el ácido hialurónico, mientras que aquellos que contienen PVA soportan unos minutos más aunque también terminan por disolverse y formarse un hidrogel.

El grado de hinchamiento se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\%H = \frac{W_f - W_o}{W_o} \times 100 \quad (23)$$

Dónde: porcentaje de hinchamiento (%H), W_f es el peso del nanomaterial en el tiempo t , y W_o es el peso inicial del nanomaterial en el tiempo t_0 .

Tabla 20 Porcentaje de hinchamiento en los nanomateriales obtenidos.

Nanomaterial	Porcentaje de hinchamiento %H
Col-PVA	14.29
Col-SC	20.47
Col-HA	18.12
Col-PVA-SC	19.59
Col-PVA-HA	18.12
Col-SC-HA	9.29
Col-PVA-SC-HA	14.44
Col-PVA-SC-NTC	18.12
Col-PVA-SC-HA-NTC	7.82

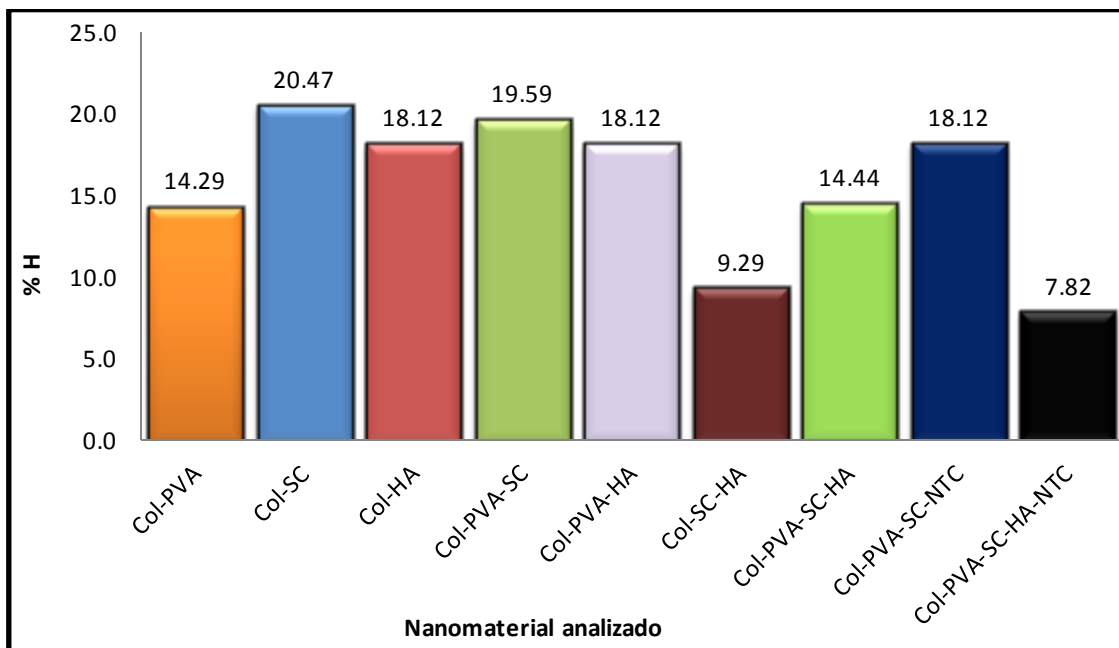


Figura 55 Resultados de la prueba de hinchamiento de las nanofibras.

Con este análisis, es posible observar que el material formado por colágeno-SC es el que posee mayor grado de hinchamiento, seguido de la mezcla colágeno-PVA-SC, mientras que el que tiene la menor capacidad de hinchamiento es la combinación colágeno-SC-HA el cual se disuelve completamente en un minuto.

3.5.1 Sensibilidad al pH de los nanomateriales

Si un compuesto contiene grupos ionizables, es un material sensible al pH, dado que la ionización está determinada por el pH en términos de ionización de equilibrio. La variación del pH del medio de hinchamiento induce cambios en el grado de ionización de los electrolitos y, por tanto, un cambio en el grado de hinchamiento del material.

Estos ensayos se realizaron con la finalidad de determinar el comportamiento de los materiales obtenidos cuando están en contacto con soluciones de diferentes pH. Para el medio ácido se utilizó una solución de ácido acético (pH=1), para el medio alcalino se empleó una solución de hidróxido de sodio (pH=14) y se utilizó agua destilada como medio neutro (pH=7). Se pesaron 0.004 gr de muestra y se colocaron en 5 mL de medio (ácido, alcalino o neutro), se dejaron en contacto a temperatura ambiente y se monitorearon los tiempos de disolución completa en cada ensayo. La Tabla 21 muestra los resultados de los tiempos de solubilidad completa de los nanomateriales en diferentes pH.

Tabla 21 Tiempos de disolución de los nanomateriales obtenidas en diferentes pH.

MUESTRA	ACIDO pH=1	BASE pH=14	AGUA pH=7
Col-PVA	X	X	336 h
Col-SC	1 año	90 seg	2 h
Col-HA	1 año	60 seg	80 seg
Col-PVA-SC	X	X	144 h
Col-PVA-HA	1 año	336 h	192 h
Col-SC-HA	X	70 seg	60 seg
Col-PVA-SC-HA	X	X	192 h
Col-PVA-SC-NTC	x	X	3 h
Col-PVA-SC-HA-NTC	x	X	1.5 h

X= NO DISUELTAS

3.6 Análisis comparativo de las nanofibras poliméricas obtenidas.

La Tabla 22 muestra un análisis comparativo de las características físicas y químicas de las nanofibras obtenidas de todas las combinaciones estudiadas.

Tabla 22 Comparación de las propiedades analizadas de los nanomateriales obtenidos.

<i>Nanomaterial</i>	<i>T_g (°C)</i>	<i>T_c (°C)</i>	<i>T_f (°C)</i>	<i>%H</i>
Col-PVA	77.2	158	170	14.29
Col-SC	--	--	--	20.47
Col-HA	--	--	--	18.12
Col-PVA-SC	163	220	233	19.59
Col-PVA-HA	42.7	140	161	18.12
Col-SC-HA	115	215	242	9.29
Col-PVA-SC-HA	--	--	--	14.44
Col-PVA-SC-NTC	197	221	223	18.12
Col-PVA-SC-HA-NTC	--	--	--	7.82

Los nanomateriales marcados en color gris en la Tabla 22 se eligieron para hacer su caracterización fisicoquímica completa debido a que fueron los que presentaron mejores características y una mayor formación de nanofibras, tal y como se mostró en su análisis mediante SEM. Estos mismos se caracterizaron biológicamente, tal y como se describe en el siguiente apartado.

Capítulo IV BIOCOMPATIBILIDAD Y CITOTOXICIDAD DE LOS NANOMATERIALES EN CÉLULAS HT29

Debido a que la adhesión celular hace referencia a la cantidad de células que pueden adherirse a la superficie de un material biocompatible, y la citotoxicidad a las células que sobreviven y se reproducen en contacto con el biomaterial, estos se vuelven factores relevantes dentro de la biocompatibilidad de materiales con potencial uso como implantes biomédicos.

En este apartado se analiza el comportamiento de los nanomateriales como matriz biológica en presencia de células HT29. Los estudios *in vitro* son el primer paso que se suele utilizar para la comprensión de la interacción substrato-célula y la biocompatibilidad de los materiales. Los cultivos celulares son sistemas ideales para el estudio y observación de un determinado tipo de células bajo condiciones específicas, dado que estos sistemas no presentan la complejidad que un sistema *in vivo* conlleva, debido al gran número de variables que interaccionan.

4.1 Células HT29 como modelos de diferenciación *in vitro* de Cáncer colon rectal

Aunque es muy cierta la importancia de una alimentación saludable y del ejercicio físico en la prevención del cáncer, la población en general no sigue estas conductas. Estudios epidemiológicos recientes, han demostrado que ésta enfermedad se ha convertido en una de las principales causas de muerte hoy en día.

Particularmente, la carcinogénesis colon rectal (CCR) es un proceso multifactorial influenciado por factores ambientales y genéticos. Aunque todavía se conoce poco sobre los mecanismos de control de la diferenciación celular y la homeostasis a lo largo de las colonias, se cree que las alteraciones que tienen lugar durante la transformación neoplásica ocurren en etapas del proceso de diferenciación donde las células deben decidir su destino en el tejido: continuar en el compartimiento proliferativo *versus* transitar hacia el compartimiento terminalmente diferenciado.

Las líneas celulares derivadas de cáncer colon rectal han proporcionado una herramienta muy útil para el estudio de genes reguladores de la diferenciación intestinal y su implicación en el cáncer, en gran parte debido a la dificultad de obtener cultivos primarios a partir de células epiteliales normales de intestino. En particular, algunas líneas celulares colon rectales conservan partes del programa de diferenciación epitelial del intestino, expresando muchos de los genes característicos de las células del epitelio colónico diferenciado (por ejemplo de células absortivas o mucosecretoras), y mantienen la capacidad de formar monocapas de células polarizadas una vez que han alcanzado la confluencia en cultivos *in vitro*. Por otra parte, muchas de estas líneas celulares presentan mutaciones genéticas, así como inestabilidad cromosómica y de microsatélites similares a lo que ocurre en tumores colon rectales, lo cual es muy interesante a la hora de estudiar la conservación o pérdida de mecanismos de diferenciación celular durante la progresión tumoral. En consecuencia, estas líneas celulares son muy útiles como modelos de diferenciación celular, normal y tumoral.

La línea celular HT-29 fue establecida en 1975, derivada de células de adenocarcinoma de colon humano (Fogh J, 1975). A nivel morfológico, los cultivos de esta línea celular son heterogéneos y contienen subpoblaciones de células con diferente capacidad de diferenciación. Así pues, en condiciones estándar de cultivo, la población HT-29 contiene más de 95% de células morfológicamente indiferenciadas: durante el crecimiento hacia pos confluencia, las células se van apilando y no se polarizan, formando multicapas, y no expresan marcadores de diferenciación característicos de células del epitelio intestinal adultas. Estas células son sensibles a los fármacos quimioterapéuticos 5-fluorouracilo y oxaliplatino, que son las opciones de tratamiento estándar para el cáncer colon rectal. Además de ser un modelo de tumor de xenoinjerto de cáncer colon rectal, la línea celular HT-29 también se utiliza como un modelo *in vitro* para estudiar la absorción, el transporte, y la secreción por las células intestinales. (75).

4.2 Los nanomateriales y cáncer colon rectal

Los avances en nano ciencia y la nanotecnología han mejorado notablemente el campo de la medicina en términos de diagnóstico y la terapia del cáncer. Recientemente, hay un gran interés en el desarrollo de sistemas multifuncionales para enfoques teranósticos dentro de una única formulación, que sea capaz de combinar la detección, tratamiento, seguimiento, y las intervenciones guiadas por imágenes, lo que permitiría una entrega de monitorización de fármacos en tiempo real, la liberación y su eficacia. Los nanomateriales, tales como nanofibras, películas y nanotubos de carbono son sistemas adecuados debido a sus características únicas (6). En éste sentido Zhou Chen et al. (13), recientemente analizaron los principales mecanismos de acción de las nanofibras en sus aplicaciones como biosensores para detección de cáncer, ellos encontraron que las nanofibras poseen excelentes características de capacidad de carga, gran área superficial, porosidad, alta eficiencia de encapsulación y facilidad de modificación, por todo esto se convirtieron en excelentes candidatos para la detección de cáncer (76).

El pequeño diámetro de las nanofibras poliméricas con un área de superficie alta es útil para la transferencia de masa y de fármacos con eficiente liberación en zonas específicas para el tratamiento de células cancerígenas. La cinética de la liberación del fármaco de las estructuras depende de la selección apropiada de las técnicas, la solución de propiedades, el tipo de fármaco utilizado y adecuada puesta en marcha de los parámetros del proceso de electrospinning ((22). Azuma et al. (48) estudiaron la síntesis y aplicaciones de nanofibras de quitina y el quitosano, concluyendo que son excelentes candidatos para el transporte y liberación de fármacos para el tratamiento de cáncer.

Stefan T. Yohe et al. (77) estudiaron el efecto de las nanofibras de poli ϵ -caprolactoma en la liberación de fármacos para el tratamiento de cáncer, las cuales resultaron ser significativamente eficientes contra células cancerosas HT29.

En el 2014, Yan et al. (78) estudiaron el efecto de nanofibras de PVA-quitosano en el control de la liberación de fármacos para el tratamiento de cáncer de ovario, concluyendo que estos materiales son excelentes matrices para el transporte y liberación.

La Figura 56 muestra un diagrama de flujo que indica cómo se llevó a cabo la caracterización biológica de los nanomateriales.

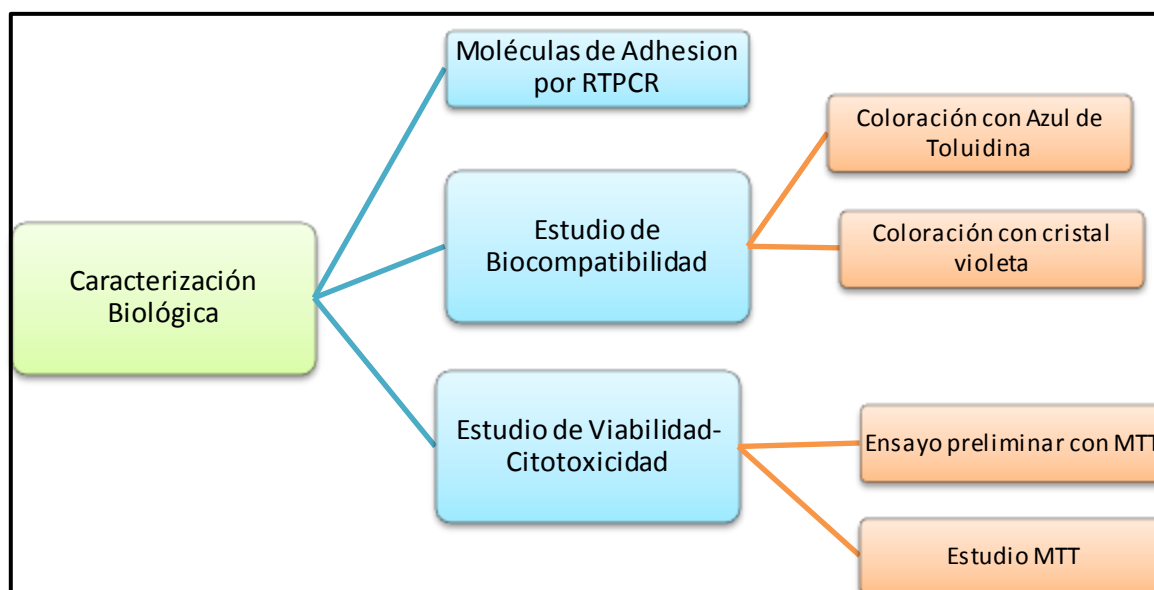


Figura 56 Esquema representativo de la caracterización biológica de los nanomateriales.

4.3 Cultivo de células HT29 preliminar

Se realizó un ensayo preliminar de cultivo celular para determinar el tiempo y el número de células que se cultivarían por pozo. Para realizar el cultivo de las células en las cajas de 96 pozos, primero se lleva a cabo el conteo de las células en la suspensión celular del matraz del cultivo primario con azul de tripano en la cámara de Neubauer (ver anexo 7.2.1).

Se sembraron de 300,000 células/pozo hasta 10 células/pozo y se observó confluencia a 0, 24, 48, 72 y 144 horas. Posteriormente se sembraron las células de acuerdo al diseño experimental de la Figura 57.

Para el cultivo se siguió el siguiente protocolo

1. Retirar el medio de cultivo del matraz del cultivo primario
2. Realizar 3 lavados con 5 mL de DMEM.
3. Agregar de 2 a 3 mL de tripsina e incubar por 10 min a 37°C y 5% CO₂.
4. Retirar las células de la incubadora y hacer vortex por 20 segundos y centrifugar por 6 minutos a 1200 rpm.
5. Decantar las células y rellenar con medio de cultivo completo.
6. Dispersar las células haciendo vortex por 30 segundos más.
7. Mezclar 100 µl de suspensión de células y 100 µl de azul de tripano, pipetear y colocar en la cámara de Neubauer.
8. Realizar el conteo de células por cuadrante de la cámara de Neubauer y calcular el volumen a sembrar en cada pozo.
9. Sembrar las células en la caja de cultivo de 96 pozos por triplicado para cada experimento.
10. Incubar las cajas con células a 37°C y 5% CO₂ y realizar cambios de medio de cultivo cuando sea necesario.
11. Observar la confluencia de las células a 24, 48, 72 y 144 horas.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	300,000 células	200,000 células	100,000 células	75,000 células	50,000 células	20,000 células	10,000 células	Medio
B	300,000 células	200,000 células	100,000 células	75,000 células	50,000 células	20,000 células	10,000 células	Medio
C	300,000 células	200,000 células	100,000 células	75,000 células	50,000 células	20,000 células	10 00,0 células	Medio
D	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio
E								
F								

Figura 57 Diseño de experimentos para el cultivo de células en los materiales.

En la Figura 58 se observan las células sembradas en una concentración de 100,000 células por pozo a: a) 24 horas con una confluencia del 40%, b) 48 horas con una confluencia del 60%, c) 72 horas con una confluencia de 80% y

finalmente d) 144 horas con un crecimiento modificado y saturado de 100%. Estos resultados se muestran gráficamente en la Figura 58, se observa que a una concentración de 100 000 células/ pozo a las 48 horas se satura el crecimiento celular, es así que esta concentración es descartada. Para una concentración de 200,000 y 100,000 células/ pozo a las 48 horas se alcanza confluencias del 80 y 60 % respectivamente, mientras que a concentraciones menores no alcanzan una confluencia mayor del 30% a las 48 horas.

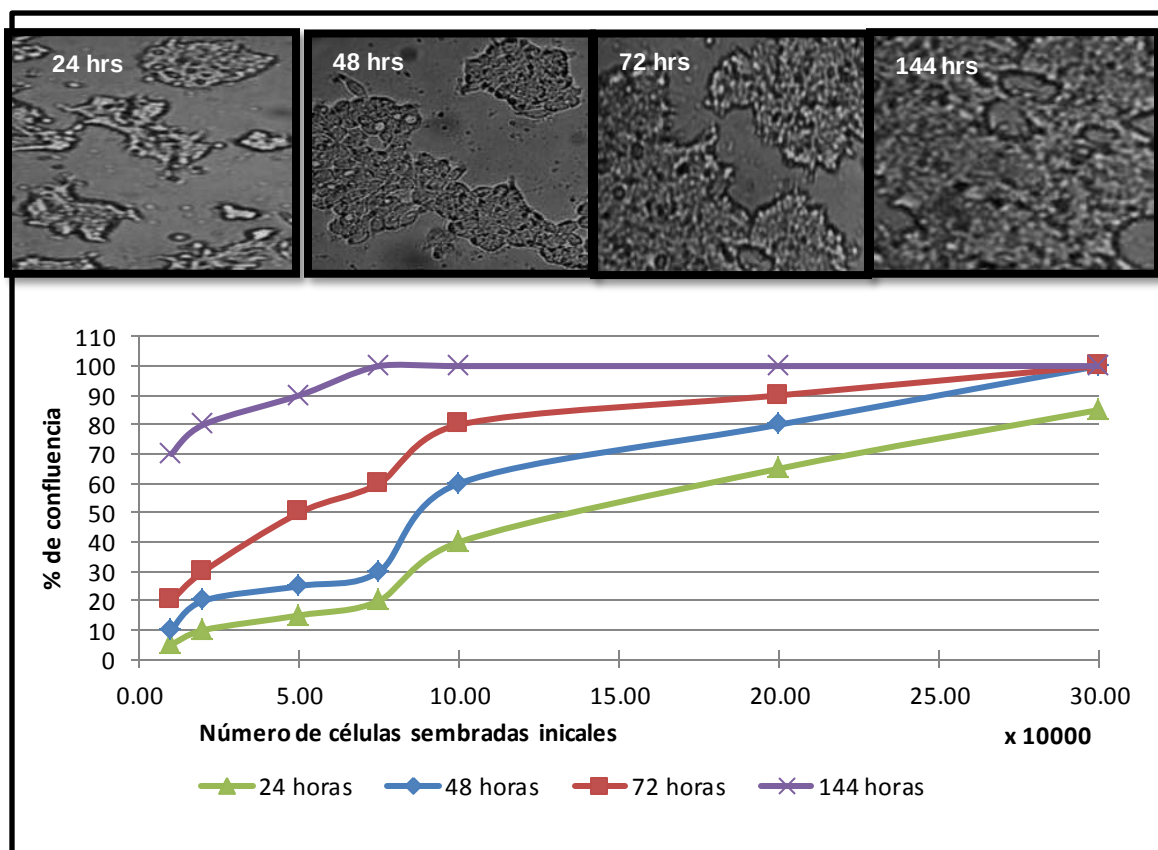


Figura 58 Fotografías de células HT29 sembradas a una concentración de 10^5 células /pozo a las 24, 48, 72 y 144 horas y representación gráfica de la confluencia observada.

Basándose en la Figura 58 se determinó como la primera incógnita la concentración de 100,000 células/pozo a un tiempo de 24 horas para los ensayos de biocompatibilidad mediante coloración con azul de toluidina y cristal violeta, y

un tiempo de 48 horas para los ensayos de viabilidad-citotoxicidad mediante el ensayo MTT, lo que permite dar tiempo suficiente a que las células dividiéndose dividan de tal forma que sea posible realizar las mediciones sin llegar a la saturación.

4.4 Cultivo de células HT29 en los materiales poliméricos.

4.4.1 Materiales y Equipos

Se utilizaron células HT29 (ATCC® HTB38™). La línea celular HT29 de adenocarcinoma de colon, recibe gran interés en estudios biológicos enfocados al cáncer de colon humano, la digestión de alimentos y viabilidad debido a su habilidad características de expresar la madurez de las células intestinales. Bajo condiciones estándar de cultivo, estas células crecen como múltiples capas indiferenciadas no polarizadas.

A continuación en la Tabla se presentan los equipos y reactivos utilizados en el desarrollo experimental.

Tabla 23 Materiales y equipos para el análisis biológico de las nanofibras.

Reactivos	Equipos
Tripsina-EDTA (0.25%)/ 25200-056 GIBCO	Vortex LSE Mixer Corner ®
Tri Reagent® /T9424 Sigma Aldrich	Microscopio Invertido Eclipse TS100 Nikon
Suero Fetal Bovino/ F6178 Sigma Aldrich	Micropipetas Eppendorf™
Medio de cultivo Mc Coy's / M8403 Sigma Aldrich	Incubadora NU4750 NuAire™
Kit MTT/ CGD1 Sigma Aldrich Solución salina balanceada de Hanks/ H8264 Sigma Aldrich	Espectrofotómetro lector de microplacas xMark BioRad
Cristal Violeta/ C0775 Sigma Aldrich Azul de Tripano/ 72-57-1 Sigma Aldrich Azul de Toluidina/89649 Sigma Aldrich SDS/L3771 Sigma Aldrich	Centrífuga Heraeus Megafluge 40 Thermo Scientific
Antibiótico (Penicilina-Estreptomicina)/ P4333 Sigma Aldrich	Campana de Flujo Laminar NU126-300 NuAire™
Agua Destilada Nanofibras poliméricas	

4.4.2 Preparación de los materiales poliméricos

Los materiales se probaron en forma de colecciones de nanofibras y películas delgadas, de las cuales se cortaron círculos de 6 mm de diámetro y se neutralizaron en 10 mL de una solución de NaHCO_3 al 2 % (w/v) durante 3 min, posteriormente se realizaron 3 lavados con 10 mL de agua destilada confirmando el pH neutro.

Los materiales se secaron a temperatura ambiente durante 24 h, se colocaron en frascos de vidrio de cierre hermético y se esterilizaron sometiéndolos a radiación UV durante 20 min.

Los discos de nanofibras previamente esterilizados se colocaron en cada uno de los pozos de cultivo en cajas de 96 pozos, las cuales fueron cubiertas y guardadas hasta ser cultivadas las células.

Se utilizaron los siguientes controles para el cultivo de células:

Control positivo: células + medio Mc Coy's+ suero 10%

Control negativo: Medio Mc Coy's sin células sin suero

Control interno 1: Medio Mc Coy's + **material polimérico**

Control interno 2: Medio Mc Coy's + **material polimérico (media luna)**

Control interno 3: Medio Mc Coy's + Células+ **material polimérico**

La siembra de las células en los materiales poliméricos se realizó siguiendo el protocolo descrito a continuación:

- 1) Retirar el medio de cultivo del matraz del cultivo primario.
- 2) Realizar 3 lavados con DMEM.
- 3) Agregar de 2 a 3 mL de tripsina e incubar por 10 min a 37° C y 5% CO_2 .
- 4) Retirar las células de la incubadora y hacer vortex por 20 segundos y centrifugar por 6 minutos a 1200 rpm.
- 5) Decantar las células y rellenar con medio de cultivo nuevo.
- 6) Dispersar las células haciendo vortex por 30 segundos más.

- 2013 7) Contar las células con azul de tripano en relación (1:1) en la cámara
2014 de Neubauer.
2015 8) Sembrar 100,000 células/pozo en la caja de cultivo de 96 pozos
2016 preparadas anteriormente con el material polimérico y cada uno de
2017 los controles como se indica en la Figura 59.
2018 9) Incubar las cajas con células a 37° C y 5% CO₂ y realizar cambios de
2019 medio de cultivo cuando sea necesario.
2020 10) Realizar ensayos de biocompatibilidad a las 24 horas y de
2021 citotoxicidad a las 48 horas.

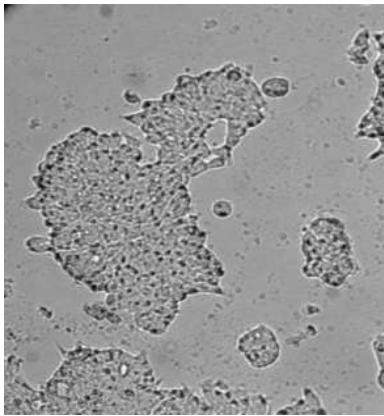
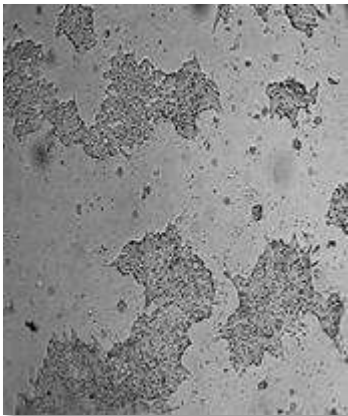
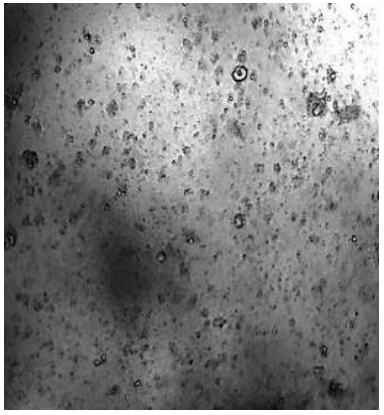
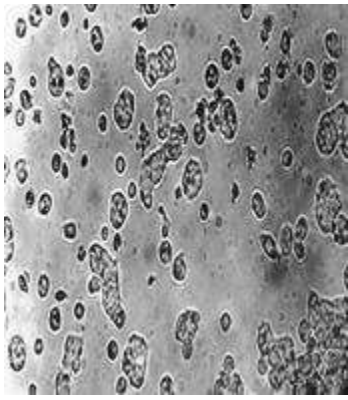
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					CL/PVA+ células	CL/PVA- SC+células	CL/PVA- HA+células	CL/HA- SC+células	CL/PVA-SC- NTC+Células	C+		
B					CL/PVA+ células	CL/PVA- SC+células	CL/PVA- HA+células	CL/HA- SC+células	CL/PVA-SC-NTC+ células	C+		
C					CL/PVA+ células	CL/PVA- SC+células	CL/PVA- HA+células	CL/HA- SC+células	CL/PVA-SC-NTC+ células	C-		
D					CL/PVA+ células	CL/PVA- SC+células	CL/PVA- HA+células	CL/HA- SC+células	CL/PVA-SC- NTC+Células	C-		
E					Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio		
F												
G												
H												

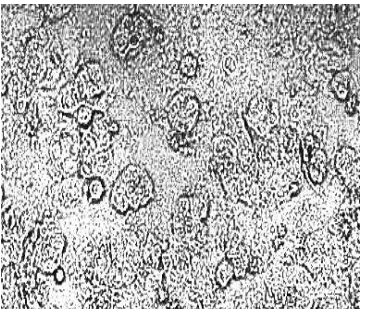
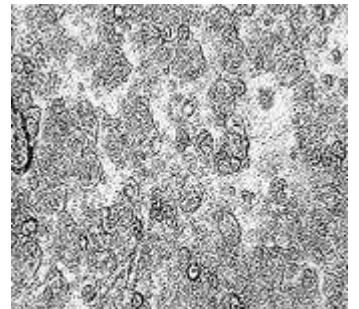
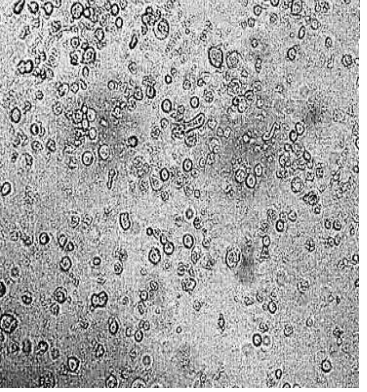
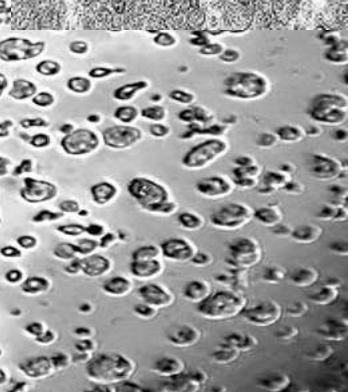
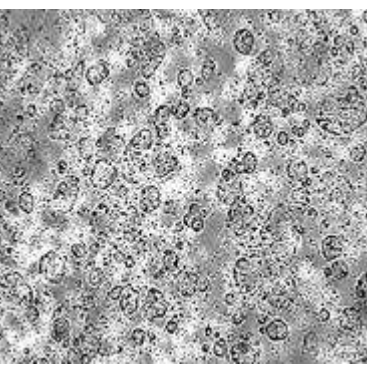
Figura 59 Disposición del diseño de experimentos para el cultivo de células en material polimérico.

2024 En las imágenes mostradas en la Tabla 24 se muestra el crecimiento de las
2025 células HT29 sobre la matriz en cada material estudiado a las 24 y 48 horas. Se
2026 puede observar claramente la tendencia de crecimiento de las células HT29, las
2027 cuales crecen exponencialmente, en el nanomaterial CL/PVA se tiene una
2028 confluencia del 40% y un 70% a las 24 hrs a las 48 horas respectivamente, en el
2029 compuesto CL/PVA–SC se tiene una confluencia del 70% a las 24 horas, mientras
2030 que a las 48 horas se presenta un crecimiento del 90%, para el compuesto
2031 CL/PVA –HA se presenta un crecimiento de 40% a 50% de 24 a 48 horas, para el
2032 compuesto CL- SC-HA la confluencia crece de un 20% a 30% de 24 a 48 horas y
2033 finalmente para el compuesto CL/PVA –SC-NTC la confluencia es de 20% a 24
2034 horas y crece hasta 30% en 48 horas. A partir de los resultados descritos
2035 anteriormente, se observa que todos los materiales presentan adhesión celular, es

2036 decir, que se observan las células viables y creciendo a las 24 horas de contacto.
 2037 Con esto, es posible concluir que las células continúan creciendo y que la matriz
 2038 que ofrece mejores características como soporte para el crecimiento de las células
 2039 HT29 es la combinación CL/PVA-SC.

2040 **Tabla 24** Confluencia de células HT29 sobre los materiales poliméricos
 2041 estudiados.

Material	24 horas de cultivo	48 horas de cultivo
CONTROL Células HT29 sembradas sin material polimérico.		
CL/PVA Células HT29 sembradas sobre nanofibras de colágeno con alcohol polivinílico.		

CL/PVA-SC Células HT29 sembradas sobre la combinación de colágeno tipo II, alcohol polivinílico y sulfato de condroitina en forma de nanofibras		
CL/PVA-HA Células HT29 sembradas sobre nanofibras formadas de colágeno, alcohol polivinílico y ácido hialurónico.		
CL/SC-HA Células HT29 sembradas sobre nanofibras de colágeno, sulfato de condroitina y ácido hialurónico		
CL/PVA-SC-NTC Células HT29 sembradas sobre el nanomaterial polimérico formado de colágeno, PVA, sulfato de condroitina y NTC en forma de película.		

4.4.3 Estudio de Adhesión celular (Biocompatibilidad)

La biocompatibilidad es la capacidad de un material para actuar con una respuesta adecuada en el medio biológico en el cual son utilizados (un ser humano u otro ser vivo). Los materiales biocompatibles son llamados biomateriales.

Estos materiales pueden estar en contacto breve o prolongado con el paciente, si es breve se corre el riesgo de cursar con una intoxicación o hipersensibilidad al material usado, en cambio si el contacto va a ser postergado o prolongado se debe tener en cuenta, que éste no provoque ningún tipo de reacción en contra del paciente, es decir, que sean materiales totalmente inertes, y una vez los materiales sean absorbidos o degradados pueden ser suplantados por el tejido normal del paciente; un ejemplo de esto son las suturas reabsorbibles utilizadas para puntos internos.

Para determinar la viabilidad celular, se estableció el grado de correlación entre las distintas densidades celulares sembradas y la absorbancia obtenida para cada muestra analizada. Estas técnicas están basadas en diferentes mecanismos para cuantificar el número de células vivas o viables, tras un tratamiento específico con un antitumoral o agente tóxico. Entre ellas se seleccionaron las siguientes: Azul de Toluidina y Cristal violeta.

4.4.4 Ensayo de Adhesión celular con azul de Toluidina

El azul de Toluidina es un colorante que tiñe estructura basófilas. Se puede comportar como colorante ortocromático (tiñe de color azul) o metacromático (tiñe de color violeta-rojo), dependiendo del pH y de la naturaleza química de la sustancia teñida. La adherencia celular o adhesión celular es la capacidad que tienen las células, tanto en los seres unicelulares como pluricelulares, de unirse a elementos del medio externo o a otras células (61). La adhesión celular se produce tanto por fuerzas electrostáticas como por interacciones inespecíficas.

El azul de Toluidina es un colorante acidofílico y catiónico (básico) metacromático de color azul que pertenece al grupo de las tiacidas utilizado

en histología, y algunas veces en el ambiente clínico. Su característica principal es que tiñe selectivamente componentes ácidos de los tejidos, tales como sulfatos y radicales fosfatos incorporados en el ADN y ARN de las células. Por ello se utiliza para hacer tinciones nucleares "*in vivo*" basándose en que las células displásicas y anaplásicas contienen cuantitativamente mayor cantidad de ácidos nucleicos y por tanto retienen la tinción. La sensibilidad de la prueba es alta y como inconvenientes se han señalado los falsos positivos que puede generar (79).

En la Tabla 25 se muestran los datos estadísticos obtenidos a partir del ensayo de biocompatibilidad con azul de Toluidina de los nanomateriales. Este ensayo ha sido descrito en el apartado 3.3.5 del Capítulo III.

Todos los materiales presentan porcentajes superiores al 100% de crecimiento celular, exceptuando el material que contiene nanotubos de carbono, lo que es un indicativo de que éste material no es biocompatible con las células HT29 provocando apoptosis.

Tabla 25 Resultados de adhesión de azul de Toluidina.

	CL/PVA	CL/PVA-SC	CL/SC-HA	CL/PVA-HA	CL/PVA-SC NTC
Medio	2.420	2.625	1.924	2.342	2.628
SD	0.145	0.156	0.331	0.168	0.147
CV%	5.991	5.954	17.200	7.186	5.597

	Densidad óptica (Promedio)	% respecto al C+	% respecto al C-
Control positivo (C+)	1.469	100.00	123.45
Control negativo (C-)	1.190	81.00	100.00
CL/PVA	2.158	146.87	181.30
CL/PVA-SC	2.425	165.04	203.74
CL/PVA-HA	1.604	109.19	134.79
CL/SC-HA	2.041	138.94	171.51
CL/PVA-SC NTC	0.829	56.43	69.66

La densidad óptica promedio de cada uno de los materiales analizados se muestra gráficamente en las Figura 60 y 61. A partir del análisis de estos resultados, se concluye que el compuesto CL/PVA-SC presenta 2.2 veces mayor biocompatibilidad con las células HT29, segundo de la combinación CL/PVA que es 1.5 veces mayor, el compuesto CL/PVA-HC 1.4 veces, mientras que la combinación CL/SC-HA 1.1 veces más que el control. Sin embargo, el compuesto CL/PVA-SC-NTC está por abajo del control en un 50 %, lo que indica el peor escenario de biocompatibilidad de todos los compuestos poliméricos estudiados, todos comparados con el control positivo. Respecto a su comparación con el control negativo, todos los compuestos presentan mayor biocompatibilidad a excepción de la combinación CL/PVA-SC-NTC.

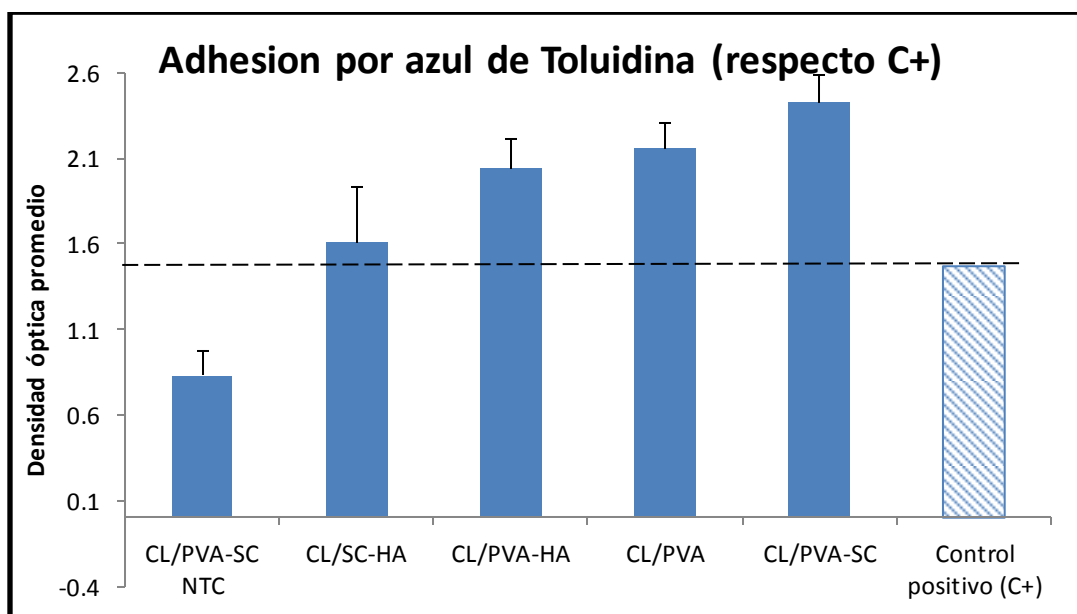


Figura 60 Resultados de adhesión celular con azul de toluidina respecto del control positivo.

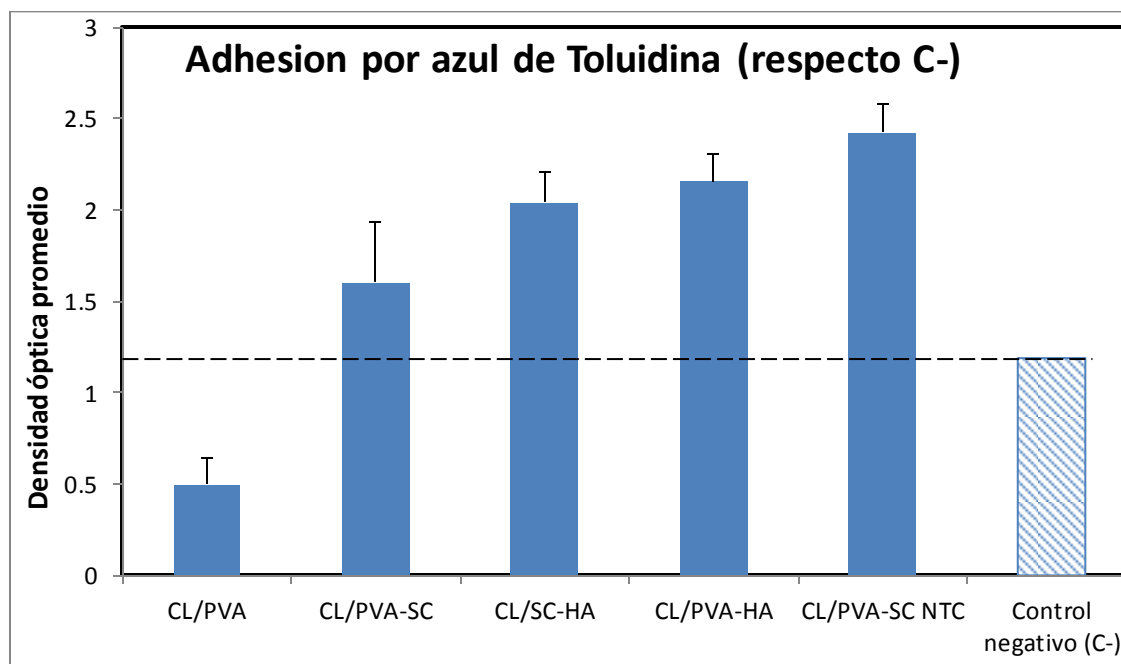


Figura 61 Resultados de adhesión celular con azul de toluidina respecto del control negativo.

4.4.5 Ensayo de Adhesión celular por cristal violeta

El violeta de metilo, comúnmente denominado cristal violeta o violeta de genciana, es el nombre dado a un grupo de compuestos químicos empleados como indicadores de pH y colorantes. Los violetas de metilo son mezclas de: N-tetra, N-penta y N-hexametil p-rosanilinas. El color del colorante depende de la acidez de la solución. En un pH de 1,0, el colorante es verde con máximos de absorción a 420 nm y 620 nm, mientras que en una solución fuertemente ácida (pH de -1), el colorante es amarillo con un máximo de absorción a 420 nm. Los diferentes colores son el resultado de los diferentes estados cargados de la molécula de colorante.

Mediante esta técnica se permite valorar de una forma rápida y sencilla la masa celular total de un cultivo celular. El método se basa en la tinción de las células con una solución al 0,25% del colorante Cristal Violeta y en cuantificar, en un lector espectrofotométrico de multiplacas, la densidad óptica (o absorbancia) del Cristal Violeta solubilizado. Este método, al medir la masa celular total y seguir la Ley de Beer – la absorbancia es directamente proporcional al número de células

en el pocillo – no permite valorar de forma global la proliferación celular, así como también los fenómenos de adhesión y de adhesión celular bajo distintas condiciones experimentales.

El ensayo de biocompatibilidad con cristal violeta se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.5 del Capítulo III.

En la Tabla 26 se muestran los resultados del ensayo de biocompatibilidad con cristal violeta, en la cual podemos observar que al igual que con azul de toluidina se presentan porcentajes mayores al 100% en todos los materiales a excepción el colágeno/PVA-SC-NTC, en el cual al parecer los nanotubos de carbono ejercen un papel contrario ya que, no solo evitan el crecimiento sino que al parecer destruyen a las células.

Tabla 26 Resultados de adhesión de cristal violeta

	CL/PVA	CL/PVA-SC	CL/SC-HA	CL/PVA-HA	CL/PVA-SC NTC
Media	1.735	2.034	1.323	1.6415	1.398
SD	0.147	0.019	0.188	0.1520	0.222
CV%	8.477	0.973	14.21	9.2615	15.88

	Densidad óptica (Promedio)	% con respecto a C+	% con respecto a C-
Control positivo (C+)	1.036	100.00	82.62
Control negativo (C-)	0.856	121.03	100.00
CL/PVA	1.535	148.17	179.32
CL/PVA-SC	1.899	183.30	221.85
CL/PVA-HA	1.043	100.68	121.85
CL/SC-HA	1.342	129.49	156.72
CL/PVA-SC NTC	0.514	49.61	60.05

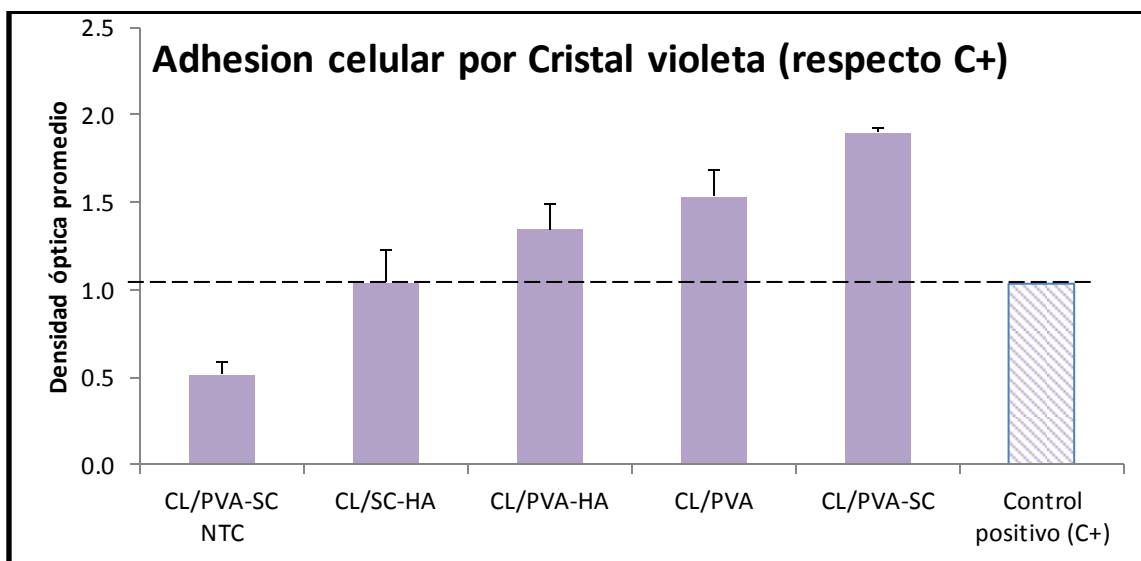


Figura 62 Resultados de adhesión celular con cristal violeta con respecto al control positivo.

En las Figuras 62 y 63 se muestran los resultados de manera gráfica de los estudios de adhesión por cristal violeta. En el caso de cristal violeta se corrobora que el compuesto CL/PVA-SC es el que presenta mayor biocompatibilidad de todos los analizados, mientras que el peor escenario lo presenta el CL/PVA-SC-NTC.

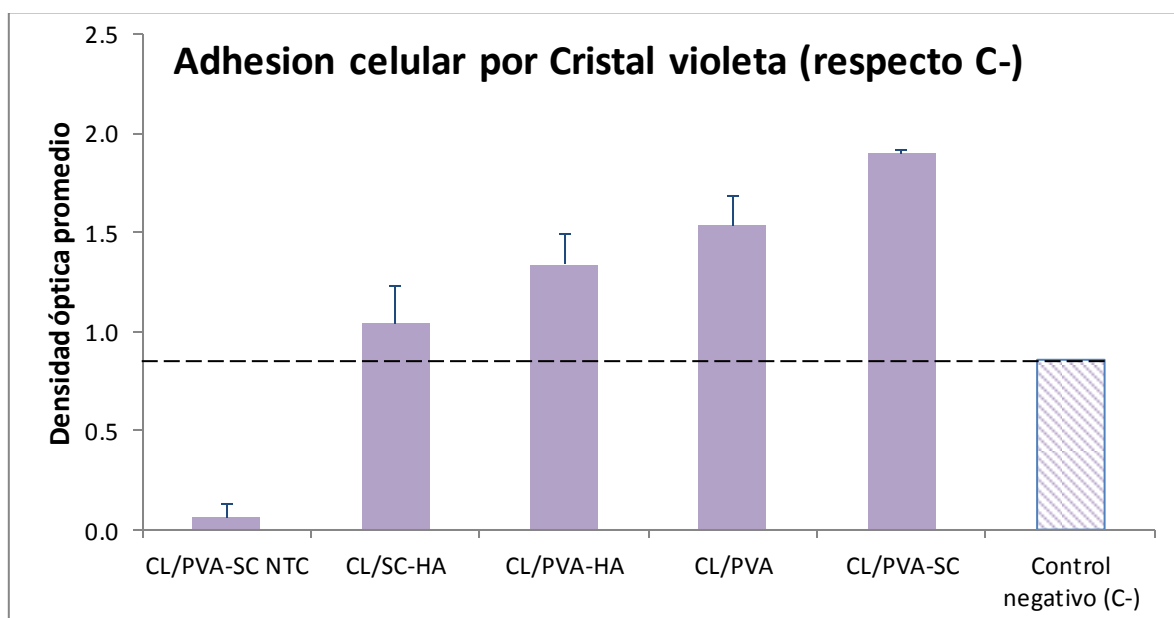


Figura 63 Resultados de adhesión celular con cristal violeta con respecto al control negativo.

4.5 Estudio de viabilidad-citotoxicidad

Para cuantificar la citotoxicidad celular de un biomaterial se emplea el ensay de MTT. Dicha prueba analiza, de manera simultánea, el proceso de proliferación celular y la viabilidad celular. Esta última se refiere a la capacidad de las células de seguir desarrollando sus funciones metabólicas de manera “saludable” ante la presencia del biomaterial. El ensayo MTT (bromuro de 3-[4-5, dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazol) es una prueba colorimétrica estandarizada, el MTT amarillo es reducido a formazán púrpura cuando hay actividad mitocondrial, por lo tanto, el formazán que se produzca dentro de la muestra es directamente proporcional a la cantidad de células vivas (80). La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado en la célula.

Al determinar la citotoxicidad de las células se determina de manera indirecta la viabilidad celular, es decir la cantidad de células vivas por diferencia de las células contadas inicialmente y de las células muertas.

4.5.1 Ensayo MTT preliminar de células HT29

Este método es simple y se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo lo puede medirse mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables. El MTT (bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazoi)-2,5- difeniltetrazólico), es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazan. El producto de la reacción, el formazan queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas. De esta forma es cuantificada la cantidad de MTT reducido mediante un método colorimétrico, ya que se produce como consecuencia de la reacción un cambio de coloración del amarillo al azul (80).

En la Figura 64 se muestra la caja de cultivo donde se realizó el cultivo primario de las células HT29, la caja de 96 pozos con las células sembradas a

diferentes concentraciones por duplicado y el medio de cultivo como control, siguiendo el protocolo anterior.

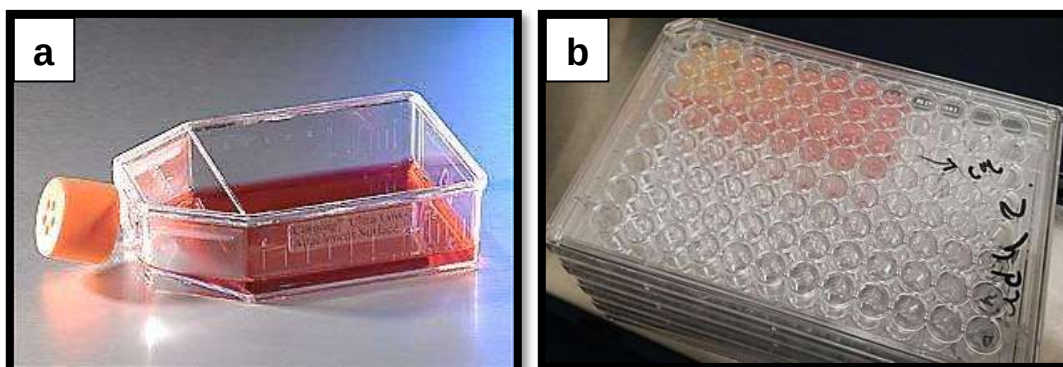


Figura 64 Células HT29 sembradas a) en cajas matraz de fondo plano y b) las cajas de 96 pozos.

Una vez descongelado, el reactivo MTT se adiciona en cada pozo de la caja de cultivo (Figura 65). Se observan las tonalidades que van de azul a verde claro para los que contienen células, las rosadas para los medios sin MTT y sin células y los colores pardos para las del medio de cultivo con MTT sin células como controles. En la Figura 66 se observa una imagen de microscopio de las células cultivadas antes de agregarle el MTT (Imagen 66 a) en la cual podemos ver las células crecidas las cuales mueren después de ser sometidas al ensayo MTT (imagen 66 b).

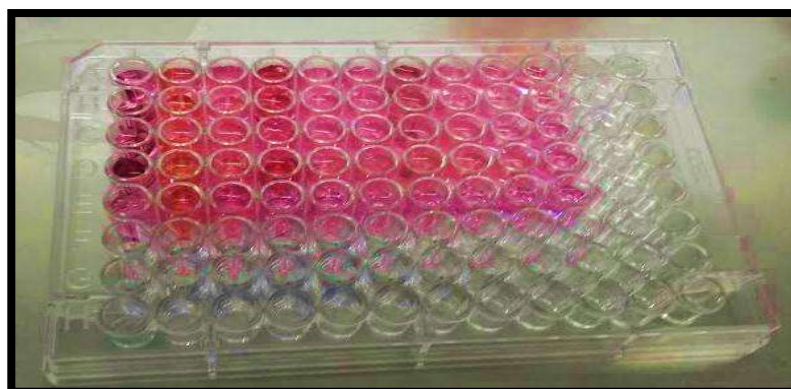


Figura 65 Caja de 96 pozos después del ensayo MTT de células HT29.

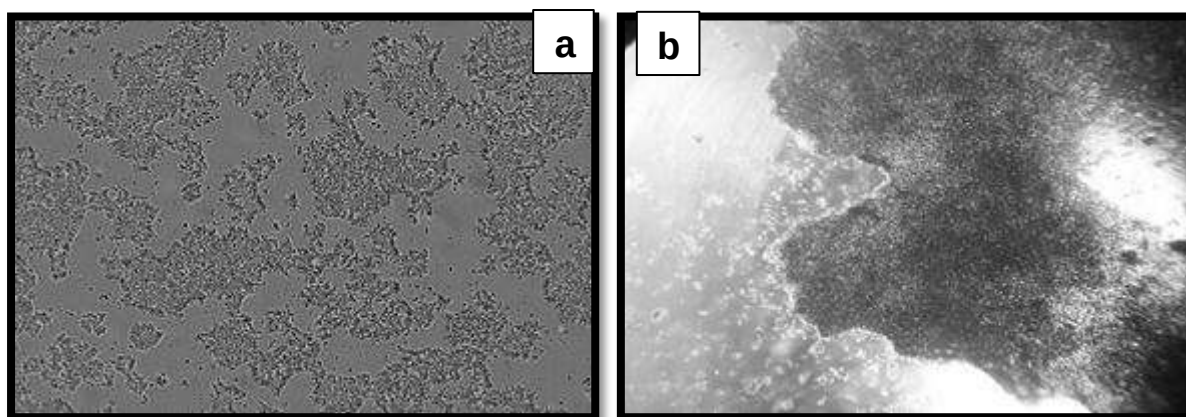


Figura 66 Células HT29 a) antes y b) después del ensayo MTT.

En la Figura 66 se muestran las fotografías de las células antes y después del ensayo MTT. En la Figura 66 a) se observan las células con una confluencia del 60 % aproximadamente para una concentración de 100 000 células/pozo. En la Figura 66 b) se observan las células en tonalidades azules y aglomeradas después del ensayo MTT.

Después del periodo de tratamiento de 2 horas con el reactivo MTT se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro lector de microplacas a 570 nm. Los resultados indican que el reactivo MTT no causó una disminución significativa en la supervivencia celular en ninguna de las concentraciones celulares evaluadas. La Tabla 28 muestra los resultados obtenidos de absorbancia.

Tabla 27 Resultados preliminares de ensayo MTT.

Número de Células	Densidad óptica (MTT)
300000.00	0.66
200000.00	0.57
100000.00	0.40
75000.00	0.39
50000.00	0.31
20000.00	0.01
10000.00	-0.16

En la Figura 67 se muestran los resultados gráficamente del ensayo MTT para cada concentración celular analizada, el cual se realizó a las 48 horas.

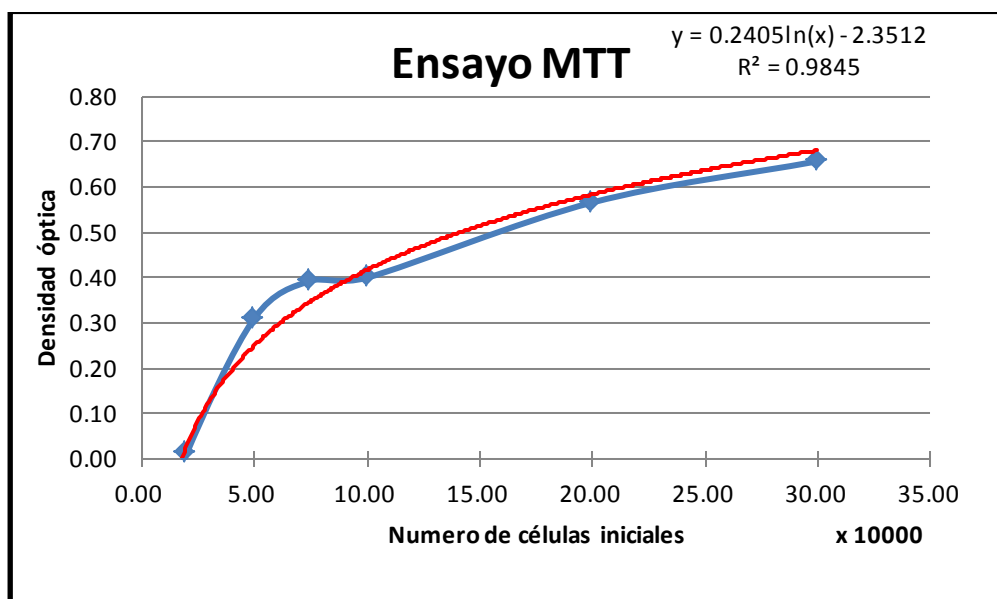


Figura 67 Resultados del ensayo MTT en células HT29.

La ecuación que representa la tendencia de datos obtenidos, donde y es la absorbancia y x es la concentración celular (cantidad de células) es la siguiente:

$$y = 0.24015\ln(x) - 2.315 \quad (24)$$

$y = \text{densidad óptica}$

$x = \text{concentración celular}$

$$\text{Despejando } x \quad (25)$$

$$y + 2.3512 = 0.24051\ln(x)$$

$$\ln(x) = \frac{y + 2.315}{0.2451} \quad (26)$$

$$x = e^{\left(\frac{y+2.315}{0.2451}\right)} \quad (27)$$

4.5.2 Ensayo MTT con materiales poliméricos

La Tabla 29 muestra las imágenes de los cultivos de los materiales poliméricos a las 48 horas de cultivo. Se observa que las células siguen creciendo, y que la matriz que ofrece mejores características como soporte para el

crecimiento de las células HT29 es la combinación CL/PVA-SC. Los resultados obtenidos después del ensayo de MTT se muestran a continuación:

Tabla 28 Resultados de viabilidad por ensayo MTT.

		Densidad óptica (Promedio)	% Viabilidad	Concentración celular (Fórmula)	
CL/PVA		0.97	148.81	6.564E+05	
CLPVA-SC		1.05	161.85	9.279E+05	
CL/SC-HA		0.68	104.28	2.013E+05	
CL/PVA-HA		0.87	133.15	4.332E+05	
CL/PVA-SC NTC		0.65	99.92	1.794E+05	
Positivo (C-)		0.3985			
Negativo (C+)		0.6505			
Compósito	CL/PVA	CLPVA-SC	CL/SC-HA	CL/PVA-HA	CL/PVA-SC NTC
Media	0.97	1.05	0.68	0.87	0.65
SD	0.01	0.48	0.04	0.17	0.07
%CV	0.73	45.96	5.91	20.11	10.88

A partir de la ecuación 28 se obtuvieron los resultados de viabilidad:

$$VIABILIDAD(\%) = \frac{\text{Densidad óptica de células tratadas}}{\text{Densidad óptica de control positivo}} * 100 \quad (28)$$

La densidad óptica está relacionada con la cantidad de células vivas, por lo que son las que forman el formazán con el reactivo MTT, el cual es detectado con el espectrofotómetro debido a la coloración formada.

En la Figura 68, 69 y 70 se muestran los resultados obtenidos de manera gráfica. Se observa que el compuesto que presenta mayor viabilidad, y por lo tanto menor citotoxicidad es el CL/PVA-SC, seguido del CL/PVA y el CL/PVA-HA. En este caso, el compuesto CL/PVA-SC-NTC nuevamente se muestra como el más citotóxico y menos viable.

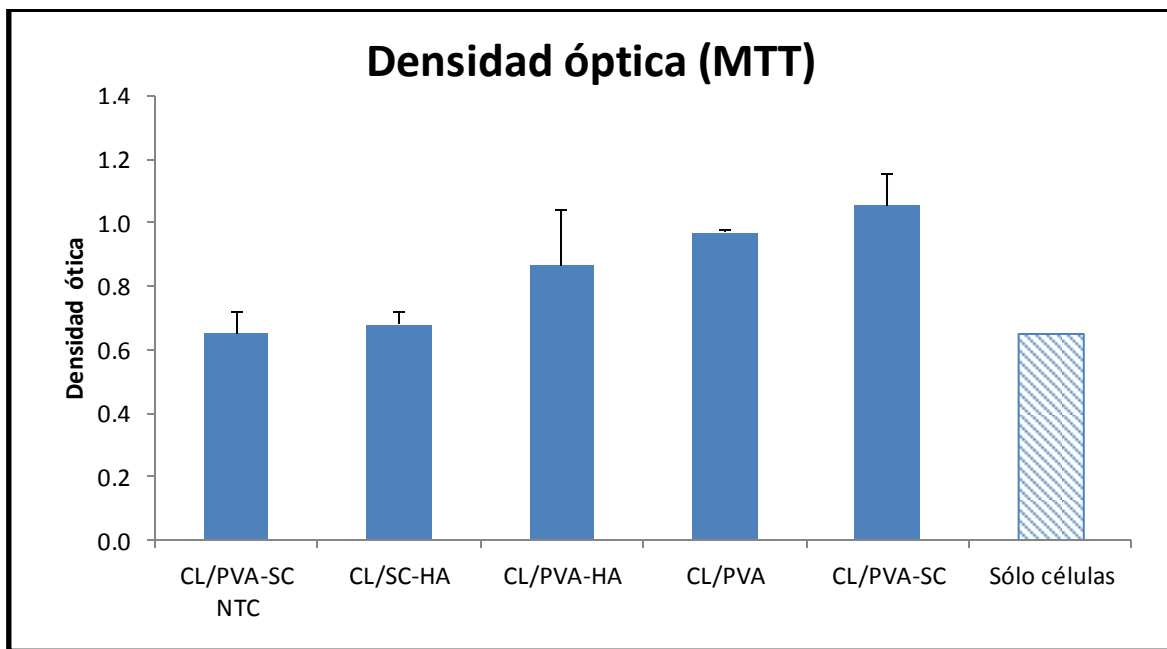


Figura 68 Resultados de MTT (Densidad óptica).

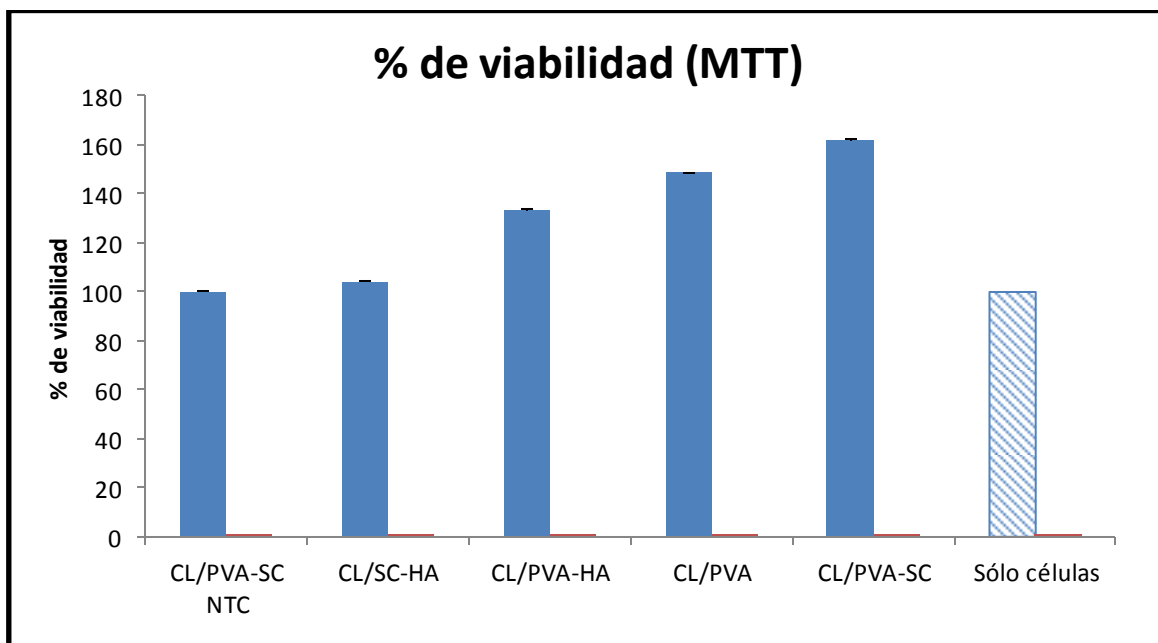


Figura 69 Resultados de MTT (% de viabilidad).

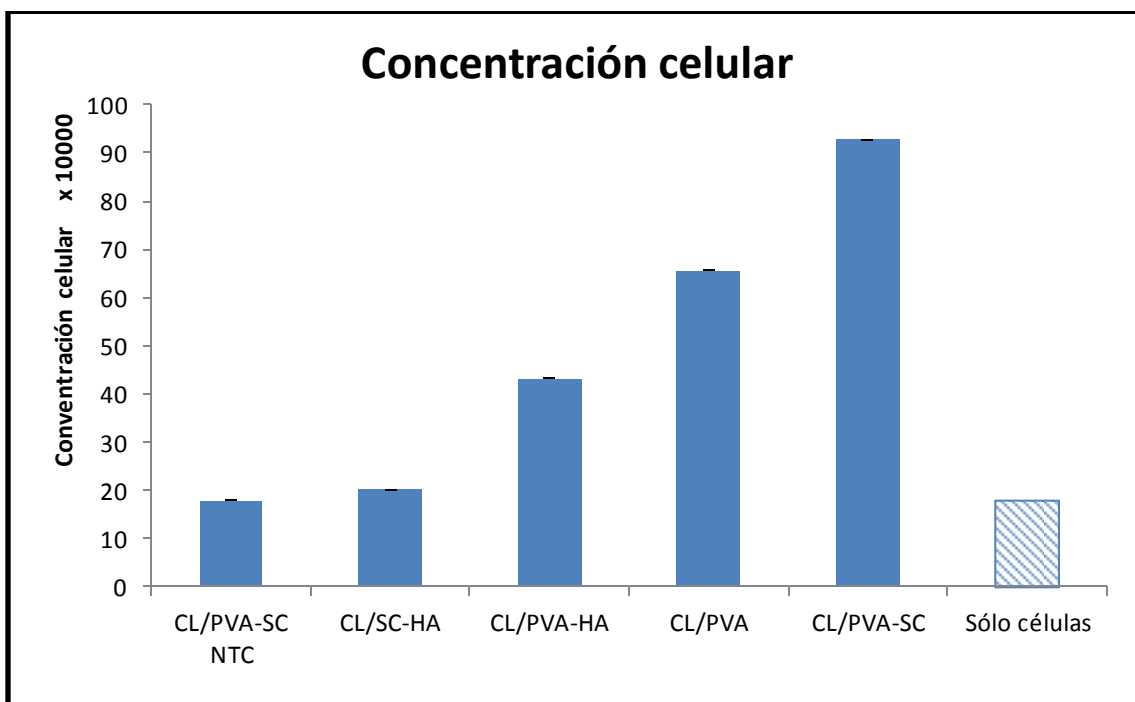


Figura 70 Resultados de MTT (concentración celular).

Comparando cada uno de los materiales poliméricos con el pozo sin materiales de prueba, se observa que todos los materiales favorecen el crecimiento y viabilidad celular, sin embargo, el compuesto CL/PVA-SC es el que presenta mayor biocompatibilidad y viabilidad celular, siendo el mejor candidato para ser utilizado como compuesto en aplicaciones biomédicas, y si es comparado con el poliestireno que es el material del cual están hechas las cajas y que en este caso sería el que está presente en contacto con las células en el pozo sin material polimérico, se puede concluir que todos los biomateriales son mejores que el poliestireno.

Capítulo V CONCLUSIONES

En el presente trabajo se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Se obtuvieron modelos matemáticos para la síntesis de nanotubos de carbono y nanofibras poliméricas considerando la calidad y rendimiento del nanomaterial deseado, así como la seguridad y costo de los procesos de síntesis.
2. Para los nanotubos de carbono la técnica de deposición química en fase vapor fue la que arrojó mejores resultados de calidad y rendimiento al menor costo.
3. Para la síntesis de nanofibras mediante el proceso de electrohilado se evaluaron los parámetros de síntesis y se determinó que la concentración de la solución polimérica, el voltaje aplicado y la distancia entre colector-aguja son los de mayor influencia en el tamaño, calidad y costo de la fibra terminada.
4. Los NTC sintetizados son de pared múltiple, altamente cristalinos, de diámetro interno de 7-8 nm y diámetro externo de 69 nm, con una longitud de 0.8 mm y con una pureza del 95%.
5. La funcionalización de los NTC por lixiviación con ácidos nítrico y sulfúrico logra colocar grupos carboxilo e hidroxilo en la superficie de los NTC, con lo que se logra una alta dispersión de estos en agua y posteriormente al mezclarlos con diferentes polímeros en solución.
6. Las nanofibras poliméricas fueron obtenidas de manera exitosa por medio de la técnica de electrohilado, las cuales alcanzaron diámetros entre 40 y 60 nm aproximadamente.
7. Los nanomateriales con nanotubos de carbono colágeno/PVA-SC-NTC y colágeno/PVA-HA-NTC fueron sintetizados en forma de película delgada por medio de la técnica de evaporación de solvente.
8. Las nanofibras con menor número de defectos y mayor calidad fueron las obtenidas de la combinación colágeno/PVA-SC. Todas las

2303 otras combinaciones presentaron grandes defectos superficiales y
2304 muy baja calidad.

2305 9. La combinación colágeno/PVA-SC presenta características físicas y
2306 químicas óptimas para ser utilizado como material biomédico, puesto
2307 que posee una excelente biocompatibilidad y viabilidad en células
2308 HT29 de colon, comparada con todos los materiales sintetizados.

2309 10. La combinación que contiene los nanotubos de carbono dentro de la
2310 matriz polimérica obtenida en forma de película delgada
2311 colágeno/PVA-SC-NTC posee un efecto citotóxico en células HT29
2312 a las 48 horas de exposición.

Capítulo VI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Visakh P, Thomas S. 2010. Preparation of bionanomaterials and their polymer nanocomposites from waste and biomass. *Waste and Biomass Valorization* 1:121-34
2. Khadka DB, Haynie DT. 2012. Protein- and peptide-based electrospun nanofibers in medical biomaterials. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 8:1242-62
3. Radhakrishnan J, Krishnan UM, Sethuraman S. 2014. Hydrogel based injectable scaffolds for cardiac tissue regeneration. *Biotechnology Advances* 32:449-61
4. Hoffman AS. 2012. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64:18-23
5. Pires ALR, Bierhalz AC, Moraes ÂM. 2015. BIOMATERIALS: TYPES, APPLICATIONS, AND MARKET. *Química Nova* 38:957-71
6. Panzarini E, Dini L. 2016. NanoMaterials Technology for Research Radiobiology. In *Radiobiology of Glioblastoma*:239-52: Springer. Number of 239-52 pp.
7. Lee Y-S, Im JS. 2010. *Preparation of Functionalized Nanofibers and Their Applications*.
8. Zhao W, Liu W, Li J, Lin X, Wang Y. 2015. Preparation of animal polysaccharides nanofibers by electrospinning and their potential biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 103:807-18
9. Agarwal S, Greiner A, Wendorff JH. 2013. Functional materials by electrospinning of polymers. *Progress in Polymer Science* 38:963-91
10. Mogoşanu GD, Grumezescu AM. 2014. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *International Journal of Pharmaceutics* 463:127-36
11. under Osteoinductive M. 2014. Special Article Series: Advanced Polymers in Stem Cell Biology & Medicine, Guest-Edited by Suwan N. Jayasinghe. *Macromol. Biosci* 14:753-7
12. Zuber M, Zia F, Zia KM, Tabasum S, Salman M, Sultan N. 2015. Collagen based polyurethanes—A review of recent advances and perspective. *International Journal of Biological Macromolecules* 80:366-74
13. Chen Z, Chen Z, Zhang A, Hu J, Wang X, Yang Z. 2016. Electrospun nanofibers for cancer diagnosis and therapy. *Biomaterials science* 4:922-32
14. Ribeiro N, Sousa SR, van Blitterswijk CA, Moroni L, Monteiro FJ. 2014. A biocomposite of collagen nanofibers and nanohydroxyapatite for bone regeneration. *Biofabrication* 6:035015
15. Asran AS, Henning S, Michler GH. 2010. Polyvinyl alcohol–collagen–hydroxyapatite biocomposite nanofibrous scaffold: Mimicking the key features of natural bone at the nanoscale level. *Polymer* 51:868-76
16. Abedi G, Sotoudeh A, Soleymani M, Shafiee A, Mortazavi P, Aflatoonian MR. 2011. A Collagen–Poly(Vinyl Alcohol) Nanofiber Scaffold for Cartilage Repair. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 22:2445-55

17. Douglas T, Heinemann S, Mietrach C, Hempel U, Bierbaum S, et al. 2007. Interactions of collagen types I and II with chondroitin sulfates AC and their effect on osteoblast adhesion. *Biomacromolecules* 8:1085-92
18. Muzzarelli RA, Greco F, Busilacchi A, Sollazzo V, Gigante A. 2012. Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: a review. *Carbohydr Polym* 89:723-39
19. Zhao W, Liu W, Li J, Lin X, Wang Y. 2015. Preparation of animal polysaccharides nanofibers by electrospinning and their potential biomedical applications. *J Biomed Mater Res A* 103:807-18
20. Ramires P, Milella E. 2002. Biocompatibility of poly (vinyl alcohol)-hyaluronic acid and poly (vinyl alcohol)-gellan membranes crosslinked by glutaraldehyde vapors. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 13:119-23
21. Toskas G, Hund R-D, Laourine E, Cherif C, Smyrniotopoulos V, Roussis V. 2011. Nanofibers based on polysaccharides from the green seaweed *Ulva Rigida*. *Carbohydrate Polymers* 84:1093-102
22. Erdem R, Sancak E. 2014. Functionalization Techniques for Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Applications: A Review. *Usak University Journal of Material Sciences* 3:180
23. Hernández-Vargas J, González-Campos JB, Lara-Romero J, Ponce-Ortega JM. 2014. A Mathematical Programming Approach for the Optimal Synthesis of Nanofibers through an Electrospinning Process. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2:454-64
24. Rogina A. 2014. Electrospinning process: Versatile preparation method for biodegradable and natural polymers and biocomposite systems applied in tissue engineering and drug delivery. *Applied Surface Science* 296:221-30
25. De Volder MF, Tawfick SH, Baughman RH, Hart AJ. 2013. Carbon nanotubes: present and future commercial applications. *Science* 339:535-9
26. Mittal G, Dhand V, Rhee KY, Park S-J, Lee WR. 2014. A review on carbon nanotubes and graphene as fillers in reinforced polymer nanocomposites. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*
27. Stout D. 2015. Recent Advancements in Carbon Nanofiber and Carbon Nanotube Applications in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Current pharmaceutical design* 21:2037-44
28. Brenner EK, Schiffman JD, Thompson EA, Toth LJ, Schauer CL. 2012. Electrospinning of hyaluronic acid nanofibers from aqueous ammonium solutions. *Carbohydrate Polymers* 87:926-9
29. Pezeshki-Modaress M, Zandi M, Mirzadeh H. 2015. Fabrication of gelatin/chitosan nanofibrous scaffold: process optimization and empirical modeling. *Polymer International* 64:571-80
30. Hameed N, Glattauer V, Ramshaw JA. 2015. Evaluation of polyvinyl alcohol composite membranes containing collagen and bone particles. *J Mech Behav Biomed Mater* 48:38-45
31. Pan L, Pei X, He R, Wan Q, Wang J. 2012. Multiwall carbon nanotubes/polycaprolactone composites for bone tissue engineering application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 93:226-34

32. El-Sherbiny IM, El-Baz NM. 2015. A Review on Bionanocomposites Based on Chitosan and Its Derivatives for Biomedical Applications. In *Eco-friendly Polymer Nanocomposites*:173-208: Springer. Number of 173-208 pp.
33. Matthews JA, Wnek GE, Simpson DG, Bowlin GL. 2002. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules* 3:232-8
34. Chen Z, Mo X, Qing F. 2007. Electrospinning of collagen–chitosan complex. *Materials Letters* 61:3490-4
35. Chen ZG, Wang PW, Wei B, Mo XM, Cui FZ. 2010. Electrospun collagen–chitosan nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell. *Acta Biomaterialia* 6:372-82
36. Zhang X, Tang K, Zheng X. 2016. Electrospinning and Crosslinking of COL/PVA Nanofiber-microsphere Containing Salicylic Acid for Drug Delivery. *Journal of Bionic Engineering* 13:143-9
37. Tian H, Chen Y, Ding C, Li G. 2012. Interaction study in homogeneous collagen/chondroitin sulfate blends by two-dimensional infrared spectroscopy. *Carbohydr Polym* 89:542-50
38. Yu C-C, Chang J-J, Lee Y-H, Lin Y-C, Wu M-H, et al. 2013. Electrospun scaffolds composing of alginate, chitosan, collagen and hydroxyapatite for applying in bone tissue engineering. *Materials Letters* 93:133-6
39. Vozzi G, Corallo C, Carta S, Fortina M, Gattazzo F, et al. 2014. Collagen-gelatin-genipin-hydroxyapatite composite scaffolds colonized by human primary osteoblasts are suitable for bone tissue engineering applications: In vitro evidences. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 102:1415-21
40. Jeon HJ, Lee H, Kim GH. 2015. Fabrication and characterization of nanoscale-roughened PCL/collagen micro/nanofibers treated with plasma for tissue regeneration. *Journal of Materials Chemistry B* 3:3279-87
41. Kumar M, Ando Y. 2010. Chemical vapor deposition of carbon nanotubes: a review on growth mechanism and mass production. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 10:3739-58
42. Hernández-Vargas J, Martínez-Gómez J, González-Campos JB, Lara-Romero J, Ponce-Ortega JM. An optimization approach for producing carbon nanotubes involving economic and safety objectives. *Clean Technologies and Environmental Policy*:1-11
43. Mubarak N, Abdullah E, Jayakumar N, Sahu J. 2014. An overview on methods for the production of carbon nanotubes. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 20:1186-97
44. Fabbro A, Prato M, Ballerini L. 2013. Carbon nanotubes in neuroregeneration and repair. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65:2034-44
45. Newman P, Minett A, Ellis-Behnke R, Zreiqat H. 2013. Carbon nanotubes: Their potential and pitfalls for bone tissue regeneration and engineering. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 9:1139-58
46. Sanchez-Valencia JR, Dienel T, Groning O, Shorubalko I, Mueller A, et al. 2014. Controlled synthesis of single-chirality carbon nanotubes. *Nature* 512:61-4

47. Wang J, Xu Y, Yang Z, Huang R, Chen J, et al. 2013. Toxicity of Carbon Nanotubes. *Current drug metabolism* 14:891-9
48. Azuma K, Ifuku S, Osaki T, Okamoto Y, Minami S. 2014. Preparation and biomedical applications of chitin and chitosan nanofibers. *Journal of biomedical nanotechnology* 10:2891-920
49. Sharma J, Lizu M, Stewart M, Zygula K, Lu Y, et al. 2015. Multifunctional Nanofibers towards Active Biomedical Therapeutics. *Polymers* 7:186-219
50. Brakmane. 2013. Cancer Antibody Enhanced Real Time Imaging Cell Probes—a Novel Theranostic Tool using Polymer Linked Carbon Nanotubes and Quantum Dots. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)* 13:821-32
51. Rad-Malekshahi M, Lempink L, Amidi M, Hennink WE, Mastrobattista E. 2015. Biomedical applications of self-assembling peptides. *Bioconjugate chemistry*
52. Gong H, Peng R, Liu Z. 2013. Carbon nanotubes for biomedical imaging: The recent advances. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65:1951-63
53. Julia Hernández-Vargas JM-G, J. Betzabe González-, Campos JL-RaJMP-O. 2015. AN OPTIMIZATION APPROACH FOR PRODUCING CARBON NANOTUBES INVOLVING ECONOMIC AND SAFETY OBJECTIVES. *Clean Technologies and Environmental Policy*:1-11
54. SCRI. 2013. Dinámica Heurística, S.A. de C.V. <http://www.dinamicaheuristica.com/index.html>.
55. Brooke A, Kendrick D, Meeruas A, Raman R. 2006. GAMS-Language guide; GAMS Development Corp. *Washington, DC*
56. Homayoni H, Ravandi SAH, Valizadeh M. 2009. Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. *Carbohydrate Polymers* 77:656-61
57. Khajavi R, Abbasipour M, Bahador A. 2016. Electrospun biodegradable nanofibers scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Applied Polymer Science* 133
58. Huang Z-M, Zhang Y-Z, Kotaki M, Ramakrishna S. 2003. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites science and technology* 63:2223-53
59. Teo W, Ramakrishna S. 2006. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology* 17:R89
60. Kim SE, Heo DN, Lee JB, Kim JR, Park SH, et al. 2009. Electrospun gelatin/polyurethane blended nanofibers for wound healing. *Biomed Mater* 4:044106
61. Maghdouri-White Y, Bowlin GL, Lemmon CA, Dréau D. 2014. Mammary epithelial cell adhesion, viability, and infiltration on blended or coated silk fibroin–collagen type I electrospun scaffolds. *Materials Science and Engineering: C* 43:37-44
62. Morie A, Garg T, Goyal AK, Rath G. 2015. Nanofibers as novel drug carrier—an overview. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*:1-9
63. Jin L, Li Y, Ren X-H, Lee J-H. 2015. Immobilization of Lactase onto Various Polymer Nanofibers for Enzyme Stabilization and Recycling. *Journal of microbiology and biotechnology* 25:1291-8

64. Elsabee MZ, Naguib HF, Morsi RE. 2012. Chitosan based nanofibers, review. *Materials Science and Engineering: C* 32:1711-26
65. Jalaja K ND, Kundu SC, James NR. 2016. Potential of electrospun core-shell structured gelatin-chitosan nanofibers for biomedical applications. *Carbohydrate polymers* 136:1098-107
66. Hassiba AJ EZM, Nasrallah GK, Webster TJ, Luyt AS. 2016. Review of recent research on biomedical applications of electrospun polymer nanofibers for improved wound healing. *Nanomedicine* 12:356-68
67. Hiremath N, Bhat G. 2015. Melt blown Polymeric Nanofibers for Medical Applications-An Overview. *Nanosci Technol* 2:1-9
68. Jiang T, Deng M, James R, Nair LS, Laurencin CT. 2014. Micro- and nanofabrication of chitosan structures for regenerative engineering. *Acta Biomaterialia* 10:1632-45
69. Li Z, Wang C. 2013. Effects of working parameters on electrospinning. In *One-Dimensional Nanostructures*:15-28: Springer. Number of 15-28 pp.
70. Eatemadi A DH, Zarghami N, Melat Yar H, Akbarzadeh A. 2015. Nanofiber: synthesis and biomedical applications. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* 1:1-11
71. Thompson CJ, Chase GG, Yarin AL, Reneker DH. 2007. Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model. *Polymer* 48:6913-22
72. Okutan N, Terzi P, Altay F. 2014. Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. *Food Hydrocolloids* 39:19-26
73. Rong Xiang EE, Yoichi Murakami,^ Junichiro Shiomi, Shohei Chiashi, Zikang Tang,, Maruyama aS. 2012. Diameter Modulation of Vertically Aligned Single-Walled Carbon Nanotubes.
74. Chen G, Seki Y, Kimura H, Sakurai S, Yumura M, et al. 2014. Diameter control of single-walled carbon nanotube forests from 1.3-3.0 nm by arc plasma deposition. *Sci Rep* 4:3804
75. Mamman HB, Jamil MMA. Investigation of electroporation effect on HT29 cell lines adhesion properties. *Proc. Biomedical Engineering (ICoBE), 2015 2nd International Conference on, 2015*:1-4: IEEE
76. Zhou T, Wang N, Xue Y, Ding T, Liu X, et al. 2015. Development of biomimetic tilapia collagen nanofibers for skin regeneration through inducing keratinocytes differentiation and collagen synthesis of dermal fibroblasts. *ACS applied materials & interfaces* 7:3253-62
77. Yohe ST, Herrera VL, Colson YL, Grinstaff MW. 2012. 3D superhydrophobic electrospun meshes as reinforcement materials for sustained local drug delivery against colorectal cancer cells. *Journal of controlled release* 162:92-101
78. Yan E, Fan Y, Sun Z, Gao J, Hao X, et al. 2014. Biocompatible core-shell electrospun nanofibers as potential application for chemotherapy against ovary cancer. *Materials Science and Engineering: C* 41:217-23
79. Ensayos de proliferación, adhesión y migración celular in vitro.

80. Tolosa L, Donato MT, Gómez-Lechón MJ. 2015. General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*:333-48
81. Arya M SI, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR... . 2014. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics* 1:1-5
82. Bustin SA NT. 2013. Analysis of mRNA expression by real-time PCR. *Real-Time PCR: Adv Technol Appl* 51:111-35

Capítulo VII ANEXOS

7.1 Técnicas de Caracterización

Con el fin de obtener las propiedades físicas y químicas de los materiales sintetizados, en el presente trabajo se emplearon diferentes técnicas de caracterización, cada una con un objetivo particular. A continuación se mencionan las técnicas empleadas para comprobar o identificar propiedades de los materiales y para evaluar sus propiedades de biocompatibilidad y viabilidad celular.

7.1.1 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Esta técnica se emplea para determinar de manera más exacta el espesor de la película de los NTC formados dentro del tubo vycor y para observar la formación de las nanofibras poliméricas, así como su diámetro y presencia de defectos superficiales.

7.1.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología de los nanomateriales obtenidos fue analizada por medio de un Microscopio Electrónico de Barrido JOEM JSM 6400 del Instituto de Investigaciones Metalúrgicas de la UMSNH.

7.1.3 Análisis Termogravimétrico

El equipo empleado en esta técnica es un Perkin Elmer modelo Pyris 1 TGA. Se utilizó una rampa de calentamiento de 15°C/ minuto con un flujo de aire de 75 cm³/minuto desde temperatura ambiente hasta 800°C para caracterizar los NTC.

7.1.4 Espectroscopia Raman

Se empleó un equipo Dilor micro-Raman modelo Labarm equipado con un láser He-Ne de 20 mW, con longitud de onda de 632.8 nm.

7.1.5 Espectroscopía de Infrarrojo

El análisis Infrarrojo se realizó en un equipo de Infrarrojo marca Perkin Elmer Universal ATR Sampling Accessory del departamento del Posgrado de Ingeniería Química de la UMSNH.

7.1.6 % Hinchamiento

Este análisis se realizó para determinar la capacidad que tienen de absorber agua las muestras obtenidas.

7.1.7 Calorimetría Diferencial de Barrido

El equipo empleado en ésta técnica fue un Mettler Toledo 822. Se utilizó una primera rampa de calentamiento de 20K/ minuto de 30 °C a 150 °C, se mantuvo en dicha temperatura durante 10 minutos para posteriormente ser enfriado hasta 30 °C utilizando una segunda rampa de 10 k/minuto, esto con la finalidad de quitar toda la humedad de las muestras, posteriormente se llevó de 30 °C a 500 °C utilizando una rampa de 10 k/minuto. Se empleó para determinar la estabilidad térmica de las muestras y la temperatura de transición vítrea.

7.2 Caracterización biológica

La adhesión celular fue monitoreada mediante las técnicas colorimétricas de azul de Toluidina y cristal violeta. Y la citotoxicidad/biocompatibilidad fue medida mediante el uso de la técnica colorimétrica MTT.

7.2.1 Análisis de las moléculas de adhesión por RT-PCR

El análisis PCR en tiempo real se ha venido utilizando ampliamente para estudiar la expresión de genes durante la adhesión celular (81). Las moléculas de adhesión celular (CAM) son proteínas de superficie celular, las cuales determinan la adherencia homofílica, entre células del mismo tipo así como la adherencia heterofílica que tiene lugar entre células de distinto tipo o bien entre las células y la matriz extracelular (82).

La adherencia de células a la superficie de otras células o a matrices extracelulares se lleva a cabo por moléculas específicas de adhesión que se comportan como receptoras de señales. Los ligandos que interactúan con las

moléculas de adhesión son generalmente insolubles, presentes en células adyacentes o como componentes de la matriz extracelular. Numerosas proteínas de la superficie celular (CAMs) son expresadas en la adhesión celular de las células HT29, siendo las clases principales: e-cadherinas, Claudina, ocludina, VCAM, ICAM, GDMPH, β -catenina, β -2 microglobulina (81). Un primer es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN. Es una secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3'hidroxilo libre que forma pares de bases complementarios a una hebra molde y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde.

Previo a la realización de las pruebas de adhesión se realizó el diseño de los oligonucleótidos en el software Oligo 6 para emplear como primers de las proteínas de adhesión los cuales son mostrados en la Tabla 29:

Tabla 29 Diseño de primers por RT-PCR para células HT29

Proteína	Primers
e-cadherina	CTT GTT TCT TCG GAG GAG
	GCT TGG TGC AAC GTC GTT A
ICAM	ACT CCA ATG TGC CAG GCT T
	CAT TAT GAC TGC GGC TGC TAC
VCAM	GGA ATT AAC CAG GCT GGA AGA
	GGG CCT TTC GGA TGG TAT
Claudina	CTC ACA GGC CAT TCA GGT CTT
	AAT GCT GGC ACC GAC ATA AG
GAPDH	CAC TGC CAC CCA GAA GAC TGT G
	TGT AGG CCA TGA GGT CCA C
Ocludina	ACA CTG GCC TAC AGG AAT ACA
	CTG CAG ATC CCT TCA CTT G
B-catenina	GGC CTG GTT TGA TAC TGA C
	TGT GGC AGA TTT ACA AAT AGC
β -2 microglobulina	GAG GCT ATC CAG CGT ACT CCA A
	CAC ACG ACA GGC ATA CTC AT

7.2.2 Técnica para conteo de células por el método de exclusión con azul de Tripano

El azul de Tripano es una de varias manchas recomendadas para su uso en procedimientos de exclusión de tinte para el recuento de células viables. Este método se basa en el principio de que las células vivas (viables) no toman ciertos tintes, mientras que las células muertas (no viables) hacen. La tinción facilita la visualización de morfología de las células.

Para determinar la viabilidad celular se emplean diferentes métodos. El más común es el de tinción con azul Tripano. El azul Tripano es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. Así pues las células que aparecen en la imagen, claramente de color azul, son consideradas no viables. Asimilar células blancas, por exclusión, a células viables es un error pues por este método se sobrevalora la viabilidad de las células en la suspensión, determinando como inviables sólo aquellas con la membrana rota. En la imagen se han representado células vivas como puntos blancos y células muertas (teñidas con azul tripán) como puntos azules. Corresponde a una de las áreas de contaje de la cámara de Neubauer (1 mm²).

Para realizar el conteo celular se utilizó un hematocitómetro (Cámara de Neubauer, ver Figura 77), que contiene dos cámaras grabadas y graduadas con diferentes tamaños de cuadrículas, se tomaron en cuenta los cuadrantes de las cuatro esquinas. El grabado corresponde a una cuadrícula de 3x3 mm y esta a su vez está distribuida en cuadrantes de 1mm², por lo que la cantidad de células contadas en cada uno, serán la cantidad por mm². La profundidad de la cámara es de 0.1mm, con un volumen concentrado en un cuadrante de 0.1mm³ o su equivalente a 1 x 10⁻⁴ml (0.0001 ml).

El número de células se determinó mediante el recuento en hemocitómetro (cámara de Neubauer) y un microscopio óptico utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{No.de células}}{\text{Volumen de solución}} = \frac{\text{No.de células vivas} * \text{factor de dilución}}{\text{No.de cuadrantes contados}} * 10000 \quad (29)$$

$$VIABILIDAD (\%) = \frac{\text{Total de Células vivas (sin teñir)}}{\text{células totales (sin teñir y teñidas)}} * 100 \quad (30)$$

Dónde:

-El valor del factor de dilución es 2, debido a que se utilizó una mezcla 1:1 de suspensión celular y tinción azul de tripán.

-El valor del n° de cuadrante es 4.

El valor de 10.000, es para obtener el número de células por ml. Debido a que el volumen de cada uno de los cuadrantes de la cámara de Neubauer contiene 0,1µl.

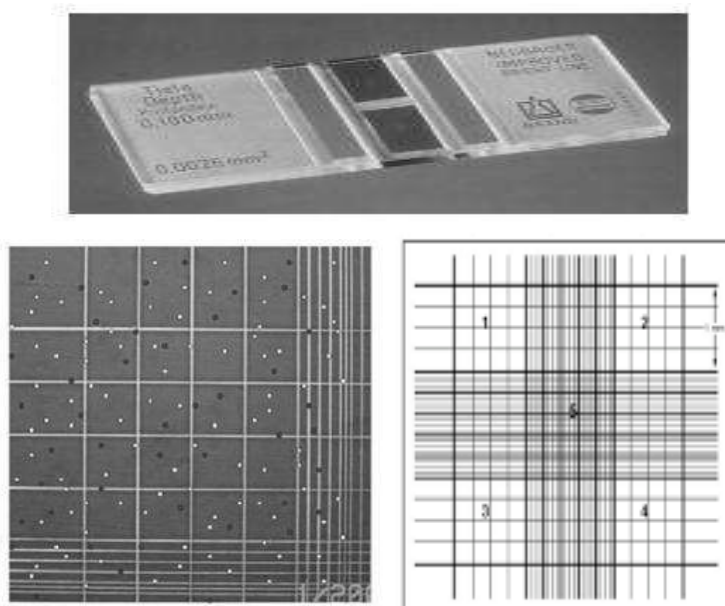


Figura 71 Conteo de células por exclusión con azul de Tripano mediante un Hematocitómetro

7.3 Publicaciones científicas realizadas

En esta sección se presentan los artículos científicos publicados en revistas indexadas del presente trabajo. Se realizaron 3 publicaciones en total las cuales son despiden a continuación y son presentados al final de éste capítulo.

TITULO DE LA PUBLICACION	RESUMEN
Chitosan/MWCNTs-Decorated with Silver Nanoparticle Composites: Dielectric and Antibacterial Characterization (Noviembre del 2013)	Se analizan las propiedades dieléctricas de nanocompuestos formados por una matriz de quitosano (QT), al cual se le han incorporado nanotubos de carbono (NTC) y nanopartículas de plata (AgNP) lo que permite aumentar su conductividad, mejorar sus propiedades mecánicas y a la vez potenciar su efecto antibacterial, con lo que es posible ampliar su espectro de aplicación específicamente en aquellas aplicaciones donde la higiene es un factor clave, tal es el caso del campo de la biomedicina.
A Mathematical Programming Approach for the Optimal Synthesis of Nanofibers through an Electrospinning Process (Diciembre del 2013)	Se proponen un conjunto de relaciones para determinar el diámetro y el costo por cada miligramo de nanofibras obtenidas por el proceso del electrospinning como una función de algunas variables independientes que participan en el proceso (es decir, concentración de polímero, el voltaje, la distancia entre los electrodos, la velocidad de inyección, la temperatura y el costo de producción.
An optimization approach for producing carbon nanotubes involving economic and safety objectives. (Marzo del 2015)	Se presenta un enfoque de optimización para determinar el mejor método de síntesis y sus condiciones de operación correspondientes para la síntesis de NTC de forma segura, económica, con alto rendimiento y calidad de los materiales finales como funciones objetivo.