



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

TESIS

“El Rol de Naturaleza Química del Polímero Empleado como Agente Reductor en la Síntesis de Nanopartículas Metálicas”

Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Químicas

Presenta

Q.F.B. Alejandra Pérez Nava

Asesora:

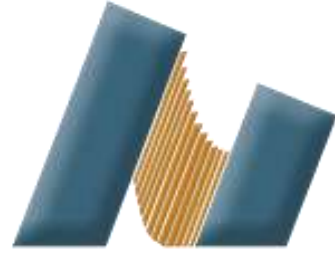
D. C. Janett Betzabe González Campos

Co Asesor:

D. C. Josué David Mota Morales

Morelia, Mich., Julio de 2016





El presente proyecto de investigación fue realizado en el laboratorio de Biopolímeros del IIQB-UMSNH con recursos otorgados por el CONACyT al proyecto CB-2010-150767; parte fundamental de este trabajo se realizó por colaboración con el CNYN-UNAM dentro de los proyectos 261425 y 252774.



Los ensayos *in vitro* fueron realizados como proyecto de estancia de investigación en los laboratorios de Biotecnología Médica y Farmacéutica del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C, financiado por CONACyT-SSA (FOSSIS-2014-01-234073) bajo la asesoría de la Dra. Sara Elisa Herrera Rodríguez.

Los resultados se presentaron en:

- **2014** 2° Congreso Bio-in
- **2014** 9° Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación
- **2014** 3rd US-Mexico Symposium on Advances in Polymer Science
- **2015** XXXVI Encuentro Nacional y III Congreso Internacional AMIDIQ
- **2015** V International Symposium on Bioengineering
- **2015** 10° Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación
- **2016** XXXVII Encuentro Nacional y IV Congreso Internacional AMIDIQ
- **2016** II Simposio de Nanociencias y Nanomateriales

ABSTRACT

Silver and gold nanoparticles were synthesized in poly(vinyl alcohol) (PVA) and chitosan (CTS) solutions after 30 minutes of exposure to sunlight. This green one-step synthesis was performed with non-additional reducing, dispersing or stabilizing agents, without stirring and artificial energy to drive the chemical reduction of metal salts. This protocol provides a facile, economic, efficient and more eco-friendly technique for the synthesis of noble metal nanoparticles (MNPs) where both polymers act simultaneously as reducing, dispersing and stabilizing agent and as the matrix in the final nanomaterial. The production of PVA/MNPs and CTS/MNPs composites is discussed in terms of time reaction, morphology and MNPs size distribution, and comparing the reduction induced by sunlight with those using UV irradiation or thermo-mechanical treatment. Polymer/MNPs solutions were processed into biofilms with homogenous dispersion of MNPs, and high quality nanofibers mats were obtained by electrospinning.

These hybrid materials possess promising applications in medicine, however due to the recent consolidation of nanotechnology as research area, it is essential to analyze the behavior of nanomaterials in living systems. In this sense, biocompatibility of polymer/MNPs nanocomposites remains questionable because of possible cytotoxic effects to living tissues, compromising their proper function. Therefore *in vitro* biocompatibility tests were performed, demonstrating that the produced polymer/MNPs nanocomposites are no-toxic and highly biocompatible against intestinal epithelial cells (HT-29).

RESUMEN

La síntesis de nanopartículas de plata y oro se realizó en soluciones de poli(vinil alcohol) (PVA) y quitosano (CTS) con exposición directa a la radiación solar. La síntesis verde en un solo paso fue efectuada en ausencia de agentes reductores, dispersantes o estabilizantes adicionales al polímero en cuestión, sin agitación magnética y sin la aplicación de energía artificial para la inducción de la reducción química de las sales metálicas. Este protocolo constituye un método de síntesis sencillo, económico, eficiente, rápido y eco-amigable para la obtención de nanopartículas metálicas (NPMs) donde ambos polímeros actúan como agente reductor, estabilizante y dispersante, y como matriz del nanomaterial final. La producción de compósitos PVA/NPMs y CTS/NPMs se discute en términos de tiempo de reducción, morfología, tamaño y distribución del tamaño de partícula, comparando la reducción inducida mediante radiación solar con el uso de radiación UV y un tratamiento termo-mecánico. Las soluciones polímero/NPMs fueron procesadas para la obtención de compósitos en forma de biopelículas con NPMs homogéneamente dispersas y colecciones de nanofibras de alta calidad producidas mediante la técnica de electrohilado.

Estos materiales híbridos presentan prometedoras aplicaciones en el campo de la medicina. Sin embargo, dada la reciente consolidación de la nanotecnología como área de estudio resulta imprescindible analizar el comportamiento de los nanomateriales en sistemas vivos. En este sentido la biocompatibilidad de nanocompósitos polímero/nanopartículas metálicas sigue siendo cuestionable por los posibles efectos citotóxicos que puedan presentar en contacto con tejido vivo, comprometiendo la adecuada función de los mismos. Por lo anterior se realizaron ensayos de biocompatibilidad *in vitro*, demostrando que los compósitos polímero/NPMS producidos son no-tóxicos y altamente biocompatibles con células de epitelio intestinal (HT-29).

Palabras clave: síntesis verde, nanomateriales, nanofibras, nanopartículas metálicas, polímeros.

ÍNDICE

Índice de Figuras.....	II
Índice de Esquemas.....	IV
Índice de Tablas.....	IV
Abreviaturas, Simbología y Fórmulas Químicas.....	V
1. Introducción.....	1
1.1 Hipótesis.....	5
1.2 Justificación.....	6
1.3 Objetivo General.....	7
1.4 Objetivos Específicos.....	7
2. Marco Teórico.....	8
2.1 Generalidades de los Materiales y Biomateriales	9
2.2 Quitosano.....	10
2.3 Alcohol Polivinílico.....	11
2.4 Materiales Híbridos Polímero /NPMs.....	12
2.5 Nanotecnología y Nanomateriales	13
2.6 Nanopartículas de Oro.....	14
2.7 Nanopartículas de Plata.....	14
2.8 Métodos de Síntesis.....	15
2.8.1 Métodos Biológicos	16
2.8.2 Métodos Físicos	16
2.8.3 Métodos Químicos	16
2.8.3.1 Reducción Química Fotoinducida.....	17
2.8.3.2 Importancia del Agente Reductor.....	18
2.8.3.3 Polímeros Empleados en la Síntesis de NPMs.....	19
2.9 Polímeros como Agentes Reductores.....	20
2.9.1 Compósitos Quitosano/NPMs.....	21
2.9.2 Compósitos Alcohol Polivinílico/NPMs.....	21
2.10 Obtención de Nanofibras.....	21
2.10.1 Electrospinning.....	22
2.10.2 Parámetros de Procesamiento Mediante Electrospinning.....	23
2.10.2.1 Parámetros de la Solución	23
2.10.2.2 Parámetros del Proceso.....	25
2.10.2.3 Parámetros Ambientales.....	25
2.11 Aplicaciones de los Materiales Compuestos Polímero/NPMs.....	26
2.12 Ensayos de Biocompatibilidad y Evaluación de Citotoxicidad.....	26
3. Materiales y Métodos.....	28
4. Resultados.....	34
5. Conclusiones.....	74
6. Bibliografía.....	77
7. Apéndices.....	85
Apéndice A Metodología Experimental.....	86
Apéndice B Ensayo Preliminar <i>in vitro</i>	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Materiales obtenidos de compósitos base polimérica.....	13
Figura 2	Representación gráfica de las dos estrategias de síntesis de nanopartículas.....	15
Figura 3	Ilustración de la configuración básica para electrospinning.....	25
Figura 4	a) Espectro de UV-Vis de los compósitos PVA/AuNPs; b) Compósitos PVA/AuNPs diferente concentración de PVA: 9, 8, 7 y 6 % p/v izquierda a derecha.....	36
Figura 5	a) Espectro de UV-Vis de los compósitos PVA/AgNPs; b) Compósitos PVA/AgNPs diferente concentración de PVA: 9, 8, 7 y 6 % p/v izquierda a derecha.....	36
Figura 6	a) Espectro de UV-Vis de los compósitos CTS/AuNPs; b) compósitos CTS/AuNPs diferente concentración de CTS: 0.5, 1, 1.5 y 2 % p/v izquierda a derecha.....	38
Figura 7	a) Espectro de UV-Vis de los compósitos CTS/AgNPs; b) Compósitos CTS/AgNPs diferente concentración de CTS: 0.5, 1, 1.5 y 2 % p/v izquierda a derecha.....	39
Figura 8	Compósitos en solución después de 30 min de exposición a la radiación solar ordenados de menor a mayor concentración (izquierda a derecha): a) CTS/AuNPs, b) CTS/AgNPs, c) PVA/AuNPs and d) PVA/AgNPs.....	40
Figura 9	Espectro UV-Vis de los compósitos CTS 1.5 % p/v/AgNPs a distintas concentraciones iniciales del precursor metálico.....	41
Figura 10	Espectro UV-Vis de los compósitos PVA 8 % p/v/AgNPs a distintas concentraciones iniciales del precursor metálico.....	41
Figura 11	Compósitos CTS 1.5 % p/v: a) AgNPs 0.001 % p/v (16 nm), b) AgNPs 0.01 % p/v (20 nm); compósitos PVA 8 % p/v: c) AgNPs 0.001 % p/v (12 nm), d) AgNPs 0.01 % p/v (8 nm).....	42
Figura 12	Espectro UV-Vis de los compósitos CTS 1.5 % p/v/AuNPs a distintas concentraciones del precursor metálico.....	42
Figura 13	Espectro UV-Vis de los compósitos PVA 8 % p/v/AuNPs a distintas concentraciones del precursor metálico.....	43
Figura 14	Compósitos CTS 1.5 % p/v: a) AuNPs 0.05 % p/v (7 nm), b) AuNPs 0.005 % p/v (6 nm); compósitos PVA 8 % p/v: c) AuNPs 0.05 % p/v (12 nm), d) AuNPs 0.005 % p/v (10 nm).....	43
Figura 15	Curvas de progreso de la reducción de AgNO ₃ a AgNPs en soluciones de CTS 1.5 % p/v y PVA 8 % p/v.....	45
Figura 16	Curvas de progreso de la reducción de HAuCl ₄ a AuNPs en soluciones de CTS 1.5 % p/v y PVA 8 % p/v.....	45
Figura 17	Espectro UV-Vis de los compósitos CTS 1.5 % p/v/AuNPs 0.05 % p/v distinta fuente energética.....	46
Figura 18	Espectro UV-Vis de los compósitos PVA 8 % p/v/AuNPs 0.05 % p/v distinta fuente energética.....	47
Figura 19	Espectro UV-Vis de los compósitos CTS 1.5 % p/v/AgNPs 0.05 % p/v distinta fuente energética.....	48
Figura 20	Espectro UV-Vis de los compósitos PVA 8 % p/v/AgNPs 0.05 % p/v distinta fuente energética.....	48
Figura 21	Imágenes de TEM de los compósitos polímero/NPMs obtenidos mediante distinta fuente energética: PVA/AgNPs a) lámpara UV (16 h), b) tratamiento termo-mecánico (3 h); PVA/AuNPs c) lámpara UV (16 h) y d) tratamiento termo-mecánico (3 h).....	49

Figura 22	Micrografías FE-SEM de los distintos compósitos: a) CTS 6 % p/v (ATF/CH ₂ Cl ₂)/AgNPs 0.01 % p/v, b) CTS 7 % p/v (ATF/CH ₂ Cl ₂)/AgNPs 0.01 % p/v, c) CTS 8 % p/v (ATF/CH ₂ Cl ₂)/AgNPs 0.01 p/v%, d) PVA 6 %p/v /AuNPs, e) PVA 7 %p/v /AuNPs y f) PVA 8 %p/v /AuNPs 0.01 % p/V.....	50
Figura 23	Imágenes de FE-SEM de los compósitos con 0.05 % p/v como concentración inicial de precursor metálico: en película a) CTS 1.5 % p/v/AuNPs y b) CTS 1.5 % p/v /AgNPs; en nanofibras c) CTS 8 % p/v /AuNPs y d) CTS 8 % p/v /AgNPs.....	51
Figura 24	Imágenes de FE-SEM de los compósitos con 0.05 % p/v como concentración inicial de precursor metálico: en película a) PVA 8% p/v/AuNPs y b) PVA 8 % p/v /AgNPs; en nanofibras c) PVA 8 % p/v /AuNPs y d) PVA 8 % p/v /AgNPs.....	52
Figura 25	Espectro EDX del compósito CTS/AgNPs 0.01 % p/v.....	53
Figura 26	Espectro EDX del compósito CTS/AuNPs 0.05 % p/v.....	54
Figura 27	Espectro EDX del compósito PVA/AgNPs 0.01 % p/v.....	54
Figura 28	Espectro EDX del compósito PVA/AuNPs 0.01 % p/v.....	55
Figura 29	Espectro de XPS del compósito CTS/AgNPs 3 % p/v.....	56
Figura 30	Espectro de XPS del compósito PVA/AgNPs 2 % p/v.....	56
Figura 31	Espectro de XPS del compósito CTS/AuNPs 3 % p/v.....	57
Figura 32	Espectro de XPS del compósito CTS/AuNPs 3 % p/v.....	57
Figura 33	Espectro FT-IR de los compósitos PVA/AuNPs a diferentes concentraciones del precursor metálico inicial.....	58
Figura 34	Espectro FT-IR de los compósitos PVA/AgNPs a diferentes concentraciones del precursor metálico inicial.....	59
Figura 35	Espectros comparativos de los compósitos PVA/NPMs 0.05 % p/v en fibras y películas..	59
Figura 36	Espectro FT-IR de los compósitos CTS/AuNPs a diferentes concentraciones del precursor metálico inicial.....	60
Figura 37	Espectro FT-IR de los compósitos CTS/AgNPs a diferentes concentraciones del precursor metálico inicial.....	61
Figura 38	Espectros comparativos de los compósitos PVA/NPMs 0.05 % p/v en fibras y películas.....	61
Figura 39	Perfiles de hinchamiento de las biopelículas de los compósitos a) DEMEM y b) agua destilada.....	63
Figura 40	Perfiles de hinchamiento de las nanofibras de los compósitos a) DEMEM y b) agua destilada.....	63
Figura 41	Imágenes de las células HT-29 a 24 h de incubación sobre los materiales compuestos previo a los ensayos colorimétricos, imágenes obtenidas mediante el software Motic Images Plus 2.0.....	64
Figura 42	Gráficas comparativas de los compósitos polímero/AuNPs respecto al control.....	65
Figura 43	Imágenes de las células HT-29 a 48 h de incubación sobre los materiales compuestos, imágenes obtenidas mediante el software Motic Images Plus 2.0.....	66
Figura 44	Resultados del ensayo MTT en función de la densidad óptica.....	67
Figura 45	Gráfica comparativa de los porcentajes de viabilidad.....	68
Figura 46	Gráfica comparativa de proliferación.....	69
Figura A1	Equipo de electrospinning: NaBond Technologies IIQB-UMSNH.....	88
Figura A2	Células HT-29 observadas a 10x a 24 h de cultivo. Imagen obtenida mediante el software Motic Images Plus 2.0.....	89
Figura A3	Esquema de cultivo celular.....	91
Figura A4	Confluencia de las células HT-29.....	93

Figura A5	Confluencia vs. tiempo de incubación de las células HT-29 a diferentes concentraciones.....	93
Figura A6	Confluencia de las células HT-29 observadas a distintos tiempos, número inicial de células sembradas 100,000; imágenes obtenidas mediante el software Motic Images Plus 2.0.....	94
Figura A7	Fotografía de la caja de 96 pozos después del ensayo MTT de células HT-29.....	95
Figura A8	Fotografías de las células HT-29 a) antes y b) después del ensayo MTT.....	95
Figura A9	Resultados del ensayo preliminar MTT.....	96

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1	Clasificación de los biomateriales en función a la respuesta del tejido vivo.....	10
Esquema 2	Esquema de la metodología empleada.....	29
Esquema 3	Parámetros de electrospinning para los correspondientes compósitos.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Cuadro comparativo de compósitos polímero/NPMs respecto de la concentración de la solución polimérica.....	37
Tabla 2	Solubilidad de los materiales polímero/NPMs.....	62
Tabla 3	Resultados estadísticos obtenidos a partir de las densidades ópticas de los cultivos a 24 h de incubación.....	65
Tabla 4	Resumen de resultados estadísticos obtenidos del ensayo MTT en materiales polímero/NPMs.....	67
Tabla 5	Resultados de viabilidad y número de células estimados a partir de los resultados de densidad óptica.....	68
Tabla 6	Resumen de los resultados.....	71
Tabla 7	Resumen de los parámetros de electrohilado y características finales de las colecciones de nanofibras.....	73
Tabla A1	Concentraciones para la reducción de sales metálicas.....	87
Tabla A2	Información general.....	89
Tabla A3	Información general de descongelación, propagación y criopreservación de células HT-29.....	90
Tabla A4	Especificaciones de equipos y reactivos empleados.....	91
Tabla A5	Diseño experimental.....	92
Tabla A6	Resultado de las lecturas de densidad óptica posterior al ensayo MTT.....	96

ABREVIATURAS, SIMBOLOGÍA Y FÓRMULAS QUÍMICAS

% CV	Porcentaje de coeficiente de variabilidad	IUV	Índice Ultravioleta Visible
% p/p	Porcentaje peso a peso	keV	Kiloelectrón volts
% p/v	Porcentaje peso a volumen	kV	Kilovolts
% s	Porcentaje de hinchamiento	LaB₆	Hexaboruro de lantano
% v/v	Porcentaje volumen a volumen	M⁺	Ion metálico
°C	Grados centígrados	M⁰	Núcleo metálico
µg	Microgramos	mg	Miligramos
A H1N1	Virus de influenza tipo A H1N1	min	Minutos
Ag	Plata	mL	Mililitros
Ag⁺	Iones plata	mM	Milimolar
AgNO₃	Nitrato de plata	mm	Milímetros
AgNPs	Nanopartículas de plata	MTT	Bromuro de dimetiltiazolidimetiltetrazolio
Al	Aluminio	N	Nitrógeno
ATF	Ácido trifluoroacético	NAD(P)-H	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
ATR	Reflexión Total Atenuada	NaHCO₃	Bicarbonato de sodio
Au	Oro	-NH₂	Amino
Au³⁺	Ion oro	nm	Nanómetro
AuNPs	Nanopartículas de oro	NPMs	Nanopartículas metálicas
C	Carbono	NPs	Nanopartículas
C-	Control negativo	O	Oxígeno
C+	Control positivo	OH	Hidroxilo
Ca²⁺	Ion calcio	OH•	Radical hidroxilo
CH₂Cl₂	Dicloro metano	OMM	Organización Meteorológica Mundial
Cm	Centímetros	OMS	Organización Mundial de la Salud
cm⁻¹	Centímetros recíprocos	p₀	Peso inicial
-CN	Nitrilo	PAA	Poliacrilamida
Conc.	Concentración	PAH	Hidrocloruro de polialilamina
-COOH	Carboxilo	PAN	Poliacrilonitrilo
CTS	Quitano	PEG	Polietilenglicol
Cu	Cobre	PEO	Óxido de Polietileno
D	Diámetro	p_f	peso final
DEMEM	Medio de cultivo Eagle Modificado de Duplecco	PMA	Ácido polimetacrílico
DS	Desviación Estándar	PVA	Alcohol polivinílico
EDX o EDS	Dispersión de Energía de Rayos X	PVP	Polivinilpirrolidona
ELISA	Enzyme-Linked Inmuno Sorbent Assay Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas	RPS	Resonancia de Plasmón Superficial
F	Flúor	SDS	Dodecilsulfato sódico
FDA	Food Drug Administration Administración de Alimentos y Medicamentos	-SH	Sulfhidrilo
FE-SEM	Microscopia Electrónica de Barrido por Emisión de Campo	TEM	Microscopia de Electrónica de Transmisión
FT-IR	Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier	TM	Trade Marc
H	Horas	UV	Ultravioleta
HAuCl₄	Ácido cloroáurico	UV-Vis	Ultravioleta Visible
HT-29	Células de adenocarcinoma colo-rectal	VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
		XPS	Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X
		λ	Longitud de onda
		λ_{max}	Longitud de onda máxima

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la producción de nanomateriales avanzados es una de las principales metas de la nanotecnología. El continuo crecimiento de esta área de estudio reside en las novedosas aplicaciones desarrolladas a partir de las singulares propiedades físicas, catalíticas, ópticas, electrónicas, magnéticas y biomédicas que se generan como consecuencia de sus reducidas dimensiones. La obtención de dichos materiales no solo se limita a la miniaturización de la materia sino que se orienta al reordenamiento atómico que como resultado genera interés para nuevas aplicaciones tecnológicas en múltiples sectores. Específicamente en el ámbito de la biomedicina se han estudiado durante décadas las propiedades que presentan distintos materiales poliméricos siendo evidente que dichas aplicaciones se potencializan cuando se recurre a su uso como parte de un compuesto polímero/nanopartículas metálicas.

La principal ventaja del diseño de nanomateriales compuestos de polímero/nanopartículas metálicas es la suma de las cualidades que cada uno de los componentes presenta de manera aislada. De esta forma, combinaciones de nanopartículas de oro y plata en matrices poliméricas naturales como el quitosano, o bien, sintéticas como el alcohol de polivinilo resultan adecuadas para la aplicación como biomateriales al exhibir biocompatibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad. Es por ello que en el último lustro ha aumentado el número de investigaciones en torno a la generación de materiales híbridos en sencillos pasos que simultáneamente resulten eficientes y amigables con el ambiente.

A la fecha se han descrito diversas metodologías de síntesis de nanopartículas que tienen como principal propósito el control de la morfología para con ello garantizar las propiedades deseadas para cada uno de los campos de aplicación; dentro de las principales estrategias sintéticas destacan la evaporación térmica, la ablación con láser, el método coloidal y la irradiación con microondas,¹ además de los procedimientos que buscan contribuir al desarrollo de síntesis verde de nanopartículas en donde se emplean extractos de plantas² o microorganismos para su síntesis.³

No obstante, la reducción química de sales metálicas precursoras sigue siendo la metodología más empleada para la síntesis de nanopartículas metálicas debido a la facilidad de manejo y versatilidad en el uso de diferentes sales, agentes reductores, estabilizantes y dispersantes, así como diversas fuentes energéticas para inducir la reducción. Esta versatilidad propia del proceso de reducción permite integrar nuevas estrategias en el proceso de síntesis, las cuales le perfilan como una alternativa más sustentable frente a las versiones tradicionales.

En años recientes se ha evaluado la viabilidad de los polímeros como agentes reductores para la preparación de nanopartículas de metales de transición por reducción química con lo que se ha conseguido la obtención en un solo paso de materiales híbridos.^{4, 5} Dicha estrategia ha

permitido develar la capacidad que presentan los polímeros como agentes reductores de sales metálicas, siendo imprescindibles los múltiples grupos funcionales existentes en las ramificaciones de la cadena central,⁶ además de verificar su capacidad como agentes dispersantes y estabilizantes durante el proceso.

Para los fines enfocados a la biomedicina es importante el control de las dimensiones de las nanopartículas metálicas debido a que su tamaño está directamente relacionado con sus propiedades fisicoquímicas y delimitan las posibles aplicaciones. A pesar de las novedosas aplicaciones médicas que se han estudiado *in vitro*, la biocompatibilidad de nanocompuestos polímero/nanopartículas metálicas sigue siendo cuestionable por los efectos citotóxicos que puedan comprometer el tejido vivo al estar en contacto mediante distintos mecanismos del entorno celular.

Diversos estudios se han realizado en aras de evaluar la citotoxicidad en fibroblastos, células epiteliales, macrófagos y células de melanomas dando como resultados aspectos importantes a considerar en el proceso de síntesis: a) las nanopartículas con diámetros de 15 nm no ejercen citotoxicidad, sin embargo diámetros menores a 4 nm resultan altamente tóxicas para las mismas líneas celulares,⁷ b) existen concentraciones de NPMs seguras para el manejo de biomateriales eficientes e inocuos⁸ y c) la citotoxicidad de las nanopartículas de oro o plata va ligada al uso de polímeros como PAA, PAH y PMA, mientras que el empleo de biopolímeros en el proceso tiende a reducir significativamente dicha citotoxicidad.⁹

En este sentido, la reducción química en medios poliméricos es una táctica de gran utilidad en donde el polímero, a consecuencia de la complejidad que ofrece su estructura química y composición, desempeña múltiples funciones en el proceso de síntesis. Dichas preparaciones traen consigo no solo la generación *in situ* de las nanopartículas sino que en un solo paso se obtiene una solución compuesta de fácil procesamiento para su presentación final en forma de películas delgadas, hidrogeles o nanofibras, evitando la generación de subproductos al anular el uso de sustancias dispersantes, reductores químicos y estabilizantes adicionales al polímero mismo.

Dado que la reducción química de sales metálicas permite el control del tamaño y morfología como consecuencia de la adición controlada de agentes reductores y estabilizantes, así como el control de los parámetros de la fuente energética (intensidad y tiempos de exposición), es importante analizar la naturaleza del polímero empleado como agente reductor, estabilizante y dispersante sobre las propiedades finales del material compuesto. Esto permitirá el manejo adecuado de las variables de síntesis y procesamiento para la obtención del compuesto final con las propiedades deseadas. De la misma forma, el uso de energía renovable, como la luz

solar, para la inducción del proceso de reducción contribuye en gran medida tanto al ahorro de recursos naturales como a la disminución del costo en el proceso de síntesis.

El presente trabajo de tesis presenta una variante de reducción química inducida por luz solar directa que permite la generación en un solo paso de materiales compuestos en solución en ausencia de agentes reductores, estabilizantes o dispersantes adicionales al polímero mismo.

De manera adicional, se demuestra la biocompatibilidad de los materiales compuestos obtenidos como resultado de la metodología verde de la cual proceden, presentando así propiedades deseables para su aplicación en biomedicina.

1.1 HIPÓTESIS

La capacidad reductora de los polímeros implica necesariamente la presencia de grupos funcionales electrodonadores para que el proceso de reducción tenga lugar y dé origen a la síntesis en un solo paso del correspondiente material compuesto polímero/NPMs. Cumpliendo esta característica, polímeros como el quitosano y el alcohol polivinílico serán capaces de fungir como agentes reductores de sales metálicas, además de ser potenciales agentes dispersantes y estabilizantes de las nanopartículas generadas *in situ*.

La exposición a la radiación solar directa de las soluciones poliméricas conteniendo las sales precursoras suministrará la energía suficiente para inducir el proceso de reducción de dichos precursores metálicos para la generación, de manera simultánea, de una solución compuesta de fácil procesamiento. Integrando ambas estrategias, el proceso de síntesis representará una versión más eco-amigable y potencialmente biocompatible con respecto a los métodos de reducción química convencional.

1.2 JUSTIFICACIÓN

La síntesis y caracterización de nanopartículas metálicas constituye una de las áreas de investigación con mayor relevancia dentro de la nanociencia tanto por las propiedades desarrolladas individualmente como por las propiedades que se obtienen al ser introducidas en matrices poliméricas. Con anterioridad, en el equipo de trabajo del área de Biopolímeros del IIQB, se ha realizado la síntesis “verde” de nanopartículas metálicas en solución acuosa de PVA, empleando al polímero como agente reductor, dispersante y estabilizante y radiación solar para promover la reducción de las sales precursoras de nanopartículas de plata y oro (AgNO_3 y HAuCl_4 , respectivamente). Dado que en la síntesis de nanopartículas metálicas por reducción química, la naturaleza del agente reductor ejerce un papel importante en el control del tamaño y la morfología de las nanopartículas obtenidas y por ende repercute en las propiedades finales de las mismas, resulta trascendental estudiar el efecto de la naturaleza del polímero empleado como agente reductor, por lo que el presente trabajo de investigación propone el uso de un polímero sintético y uno natural para el análisis del rol que desempeña su naturaleza en la síntesis de nanopartículas de oro y plata (AuNPs y AgNPs, respectivamente).

El polímero natural, quitosano, es un excelente candidato para tal fin, ya que comparte las aplicaciones biomédicas de las nanopartículas; aunado a lo anterior las soluciones de quitosano poseen un amplio potencial para actuar como reductoras de las sales precursoras de nanopartículas metálicas bajo la técnica que se ha descrito con anterioridad, debido a la presencia de grupos $-\text{OH}$ y $-\text{NH}_2$ en las cadenas del biopolímero. De esta forma, su comparación con el uso del PVA como agente reductor permitirá la realización de un análisis detallado con el fin anteriormente propuesto.

Adicionalmente, dado que tanto las soluciones de PVA como las de CTS son fácilmente procesables, es posible la obtención de materiales compuestos PVA/AgNPs, PVA/AuNPs, CTS/AgNPs y CTS/AuNPs en forma de biopelículas delgadas y nanofibras, siendo estas últimas producidas mediante la técnica de electrohilado, lo que resulta en la obtención de materiales compuestos con propiedades deseables en el área de la biomedicina.

Finalmente, el uso de nanopartículas de oro y plata en un material compuesto base polimérica disminuirá significativamente la citotoxicidad de las nanopartículas, favoreciendo así su uso en aplicaciones biomédicas.

1.3 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar en un solo paso nanopartículas metálicas en soluciones poliméricas haciendo uso de un polímero natural y otro sintético como agentes reductores para comparar la capacidad de reducción de cada polímero en cuestión, así como las características finales de las nanopartículas generadas para la obtención de materiales compuestos biocompatibles en forma de nanofibras mediante la técnica de electrospinning.

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Producir nanocompuestos polímero/nanopartículas metálicas (NPMs) empleando radiación solar como fuente energética para inducir la reducción química.
- Realizar un estudio comparativo de la capacidad de reducción del PVA con respecto al CTS mediante la variación de la concentración inicial y evaluar el efecto sobre las características finales en las nanopartículas sintetizadas.
- Establecer diferentes concentraciones iniciales de los precursores de nanopartículas (AgNO_3 y HAuCl_4) para determinar el efecto ejercido sobre las características finales de las nanopartículas sintetizadas.
- Procesar las soluciones polímero/NPMs para la obtención de materiales finales en forma de biopelículas delgadas mediante la evaporación del disolvente y nanofibras por la técnica de electrospinning.
- Caracterizar los materiales mediante diversas técnicas de análisis instrumental: Espectroscopia de Absorción UV-vis, Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) y Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS); y estructuralmente mediante Microscopia Electrónica de Barrido por Emisión de Campo (FE-SEM) y de Transmisión (TEM).
- Evaluar la biocompatibilidad y viabilidad/citotoxicidad de células de epitelio intestinal frente a los materiales finales.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 GENERALIDADES DE LOS MATERIALES Y BIOMATERIALES

Un material puede ser definido como la porción finita de materia que conserva las propiedades características, susceptible a ser transformable para su mejor aprovechamiento. La clasificación general de los materiales contempla tres tipos desde el punto de vista mecánico:

- Cerámicos: son duros y muy frágiles.
- Metales: resistentes, tenaces y dúctiles.
- Polímeros: resistentes y de baja rigidez.

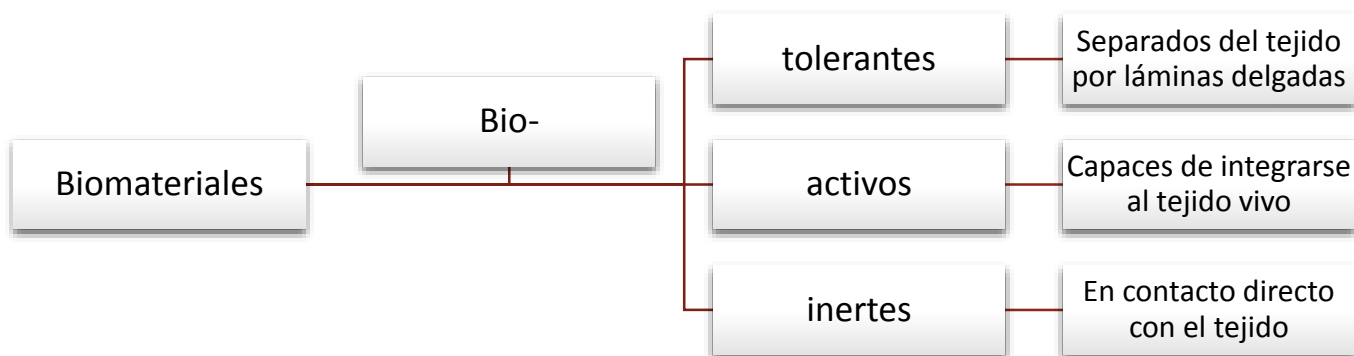
Sin embargo, existen otros dos grupos importantes de materiales:

- Materiales compuestos o compósitos: que son combinaciones de dos o más materiales diferentes.
- Semiconductores: importantes por sus propiedades eléctricas.

Como ciencia, la Tecnología de los Materiales representa un campo de estudio interdisciplinario que busca la manipulación de la composición y estructura con la finalidad de ejercer mayor control en las propiedades finales de un material a través de su síntesis o procesamiento.¹⁰

Las necesidades de cuidado y recuperación de la salud obligan el surgimiento de la rama de los biomateriales, los cuales se definen por el American National Institute of Health como “cualquier sustancia o combinación de sustancias, distintas a los fármacos, de origen natural o sintético que puede ser empleado durante un periodo de tiempo, supliendo o reemplazando parcial o totalmente un tejido, órgano o función del cuerpo humano con el propósito de mantener o restaurar la calidad de vida del individuo”. Aun cuando el uso de los biomateriales ha acompañado a la humanidad desde las primeras civilizaciones, el diseño de novedosos materiales enfocados a la medicina ha cobrado mayor auge con el estudio de la nanotecnología, la cual promete mejorar las propiedades de los materiales mediante el reordenamiento atómico.

En general, un biomaterial posee la capacidad de sustituir total o parcialmente la función de un tejido u órgano en un sistema vivo y por lo tanto su diseño debe contemplar ciertos requisitos fundamentales. Es así que una larga lista de cualidades caracteriza a un biomaterial como adecuado; su carácter no tóxico, no inmunigénico, no trombogénico, no carcinogénico, por mencionar algunas. Teniendo en cuenta el sofisticado diseño del cuerpo humano conformado por ambientes biológicos complejos, estos materiales se clasifican en tres categorías distintas de acuerdo a la reacción del tejido frente al biomaterial, por lo que pueden ser: biotolerantes, bioactivos y bioinertes.¹¹



Esquema 1. Clasificación de los biomateriales en función a la respuesta del tejido vivo.

Para las aplicaciones tecnológicas que exige la biomedicina, los polímeros son materiales adecuados. Además de ser económicos y de fácil procesado, éstos presentan características fisicoquímicas peculiares otorgadas por sus complejas estructuras y variadas composiciones elementales.

Dentro de los biomateriales, los polímeros son ampliamente estudiados por presentar excelentes propiedades para su aplicación en este campo de estudio, por lo que se han establecido como los materiales estructurales para ingeniería por excelencia, haciéndose evidente el potencial que ostentan cuando se encuentran conformando compósitos;¹² dos polímeros ampliamente utilizados en esta área son el quitosano y el alcohol polivinílico.

2.2 QUITOSANO

El quitosano (CTS) es un aminopolisacárido que se obtiene en escala industrial a partir de la *N*-desacetilación alcalina de la quitina, la cual, forma parte de la estructura de soporte en numerosos organismos vivos: artrópodos, moluscos y hongos; siendo el segundo polisacárido de mayor abundancia en la biosfera terrestre. La quitina se obtiene como subproducto importante de la industria pesquera, sin embargo es en su forma desacetilada, el quitosano, que presenta gran cantidad de aplicaciones tanto en la industria alimentaria como en la biotecnológica.

Químicamente, el término quitosano define a una familia de heteropolisacáridos lineales formados por unidades D (2-amino-2-deoxi- β -D-glucosa) y unidades A (2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucosa) conformadas por enlaces β -1-4. Desde un enfoque fisicoquímico, el quitosano es un biopolímero hidrosoluble en condiciones ligeramente ácidas, capaz de formar biopelículas delgadas, hidrogeles, andamios porosos y fibras, además de micro y nanopartículas. El carácter policatiónico que éste presenta le confiere

alta afinidad de asociación con moléculas terapéuticas y antigénicas a las cuales brinda protección frente a la degradación enzimática e hidrolítica.^{13, 14} Dentro de las aplicaciones que se le han dado, en biomedicina, se encuentran los sistemas de liberación de fármacos, el revestimiento de heridas con capacidad de promover la cicatrización y como andamios para la ingeniería de tejidos, principalmente.¹⁵

El potencial ejercido por el quitosano frente a múltiples microorganismos lo sitúan dentro de los polímeros más destacables para aplicaciones biotecnológicas. La capacidad bactericida del quitosano cubre un amplio espectro de bacterias, algas, levaduras y hongos en ensayos microbiológicos tanto *in vitro* como *in vivo* con distintas presentaciones del polímero (soluciones, biopelículas delgadas, hidrogeles y compósitos).

En la década de los 90's se describió la capacidad bactericida del quitosano, sin embargo el mecanismo de acción sigue sin ser del todo esclarecido. La tendencia más aceptada es que su poder bactericida es debido a la interacción entre los grupos amino protonados, donde el quitosano con carga positiva interactúa directamente con las cargas negativas de las membranas de los microorganismos. En este modelo las interacciones son reguladas por las fuerzas electrostáticas tanto de los grupos amino protonados como del residuos cargados negativamente, donde presuntamente compiten con los cationes Ca^{2+} por los sitios electronegativos de la superficie de la membrana celular. Las interacciones electrostáticas entre el quitosano y la membrana celular del microorganismo desenlazan en dos posibilidades para la muerte celular: i) se originan modificaciones importantes que comprometen la estructura de la pared celular generando permeabilidad, lo que provoca desequilibrios osmóticos internos y consecuentemente no solo se inhibe el crecimiento del microorganismo sino que también se induce la apoptosis y ii) la hidrólisis del peptidoglicano de la pared celular bacteriana permite la filtración de sustancias como electrolitos intracelulares, por ejemplo los iones potasio y otros constituyentes (proteínas, ácidos nucleicos, glucosa, enzimas).¹⁶

2.3 ALCOHOL POLIVINÍLICO

El alcohol polivinílico (PVA) es un polímero de carácter biodegradable, biocompatible y no tóxico que resulta de gran interés debido a la versatilidad química proporcionada por los grupos hidroxilos ramificados que posee en su estructura, los cuales hacen posible la implantación de injertos a la cadena principal del polímero.¹⁷

Es un polímero lineal sintético que se produce a partir de la hidrólisis en medio básico de poliacetato de vinilo, por lo que presenta solubilidad variable en agua pero resistencia a los disolventes orgánicos, esta característica le hace adaptable a diversas aplicaciones. Comúnmente se ha empleado en la manufactura de productos de papel,

textiles, empaquetado de alimentos, en la elaboración de dispositivos médicos, fibras de sutura para cirugía, membranas, coloides de protección bioplásticos y como excipiente de fármacos.

La FDA (Food Drug Administration) ha aprobado el uso de PVA para el embalaje de productos de consumo humano por la gran estabilidad química que presenta, además de ser un material de bajo impacto ambiental dado su carácter biodegradable. Entre las cualidades que destacan están su capacidad como barrera, mientras que en el campo de la medicina es destacable su no toxicidad, no carcinogenicidad, capacidad antiinflamatoria y la bioadhesividad que presenta.

En la historia de la medicina moderna ya se han estudiado las aplicaciones de los hidrogeles de PVA con excelentes resultados en la ingeniería de tejidos donde sirve como andamio para la construcción de implantes de páncreas artificiales, y dadas sus propiedades mecánicas resulta útil para el reemplazo de meniscos y cartílago nativo ya que logra mimetizar estos entornos funcionando también como guía para el cultivo de condrocitos para la reparación o regeneración de tejido conectivo. Además diversos dispositivos médicos pueden ser diseñados con la ayuda de las propiedades que caracterizan a este polímero: tratamientos vasculares para embolias, coberturas hidrofílicas para la regeneración neuronal y barreras adhesivas al tejido.¹⁸⁻¹⁹

2.4 MATERIALES HÍBRIDOS POLÍMERO/ NPMs

Sin duda los materiales base polímero representan alternativas prometedoras para la solución de problemáticas existentes en la actualidad. Sin embargo la combinación de matrices poliméricas con nanopartículas de metales nobles trae consigo la oportunidad de mejorar los materiales existentes al conjugarse la distinta naturaleza química de cada componente en el material final. Con esta estrategia se potencializan las propiedades aisladas de cada material adquiriéndose nuevas capacidades dirigidas al ámbito de aplicación.¹²

El estudio de los materiales compuestos se presenta actualmente como la evolución de la ciencia y tecnología de los materiales, siendo un compuesto aquel material constituido por dos o más fases que en conjunto presentan propiedades y comportamientos mejorados en comparación con el uso de cada componente de manera aislada. Adicionalmente, la disminución en las dimensiones del material compuesto a nanoescala abre la puerta a una gama de aplicaciones aún mayores. Debido a que la materia en este rango experimenta distintos procesos físicos que traen consigo la variación de las propiedades, pueden obtenerse distintos tipos de materiales según el tipo de procesamiento²⁰ (véase Figura 1).

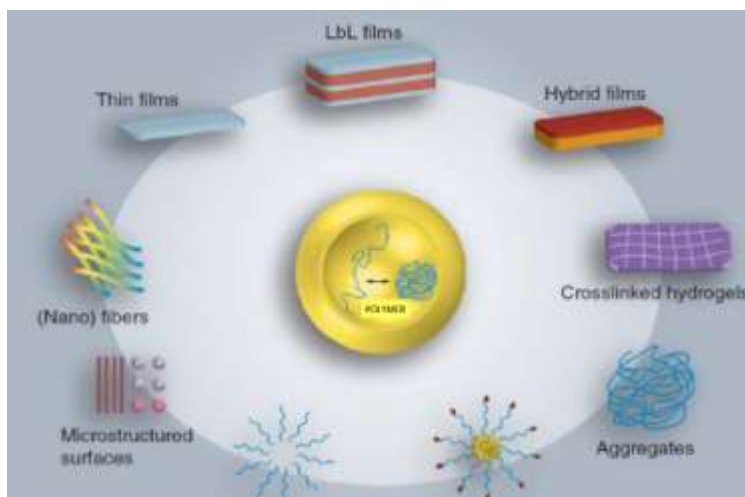


Figura 1. Materiales obtenidos de compósitos base polimérica.

2.5 NANOTECNOLOGÍA Y NANOMATERIALES

La incursión del estudio de la materia a escala nanométrica ha revolucionado la ciencia de los materiales, siendo la nanotecnología un área interdisciplinaria que en los últimos años ha atraído la atención de los sectores científicos e industriales. Su campo de aplicación involucra desde el diseño hasta la aplicación de materiales y equipos cuyas dimensiones oscilen en el rango nanométrico, su aplicación para el diseño sugiere la manipulación de la materia en el orden de mil millonésimas del metro, así como el comportamiento a nivel molecular y submolecular.

La aplicación de la nanotecnología podría brindar grandes contribuciones, siendo las de mayor repercusión aquellas que se orientan a la medicina. Aquí son posibles mecanismos de observación microscópica e imagenología, las cuales, pueden proporcionar soluciones a nivel atómico, celular y molecular. Por otra parte destaca la nanorrobótica, que resulta ser de las más sofisticadas tecnologías dando como resultado estructuras con funcionamientos específicos a mínima escala, como los nanochips.²¹

A su vez, la síntesis y aplicación de nanopartículas metálicas han fascinado a la comunidad científica por las potenciales aplicaciones posibles, destacando principalmente todas aquellas que involucran la formación de materiales compuestos polímero/NPMs orientadas a la biomedicina e ingeniería de tejidos. En general, para el campo de la medicina resultan deseables aquellas nanopartículas cuya dimensión oscile entre los 10 y 50 nm, su reducido tamaño les permite la comunicación con las biomoléculas de la superficie celular que pueden modificar las propiedades bioquímicas y fisicoquímicas de las mismas. El reducido tamaño que presentan hace posible su enfoque al desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos, imagenología y señalización de tejidos, además

mediante la funcionalización de nanopartículas metálicas con ligandos específicos (por ejemplo anticuerpos) es posible dirigir los tratamientos terapéuticos hacia células específicas como las células del cáncer. De esta forma es como la nanotecnología busca cimentar vínculos en el diagnóstico y terapia molecular.²²

2.6 NANOPARTÍCULAS DE ORO

La historia del uso de oro coloidal o suspensiones de nanopartículas de oro se remonta a la época de los romanos, quienes empleaban dichas suspensiones para construcción de vitrales con fines decorativos. La evaluación científica en la época moderna de los coloides de oro se dio hasta 1850 con el trabajo de Faraday, quien observó características bastante diferentes en comparación al oro metálico, concluyendo que el color rojo característico (de las nanopartículas de oro en solución) es debido a la presencia de partículas de diámetros menores a 100 nm o cercano al amarillo para partículas más grandes.

Las interesantes propiedades ópticas de las nanopartículas de oro son debido a su interacción única con la luz; en presencia del campo electromagnético los electrones libres de las nanopartículas del metal se someten a oscilación en conjunto, este proceso es resonante a una frecuencia particular de la luz y se denomina resonancia de plasmón superficial (RPS).

Después de la absorción, la resonancia de los plasmones superficiales decae resultando en la emisión de energía radiante, o bien, mediante la conversión de la luz absorbida en calor. Así, las nanoesferas de oro con tamaño de partícula de 10 nm de diámetro tienen una fuerte absorción máxima en torno a 520 nm en solución acuosa debido a su RPS. Estas nanoesferas muestran desplazamiento batocrómico al aumentar el diámetro debido al retraso electromagnético en partículas más grandes.²²

2.7 NANOPARTÍCULAS DE PLATA

Al igual que el oro, la plata iónica históricamente ha sido empleada con propósitos tanto ornamentales como microbicidas. En la actualidad, es importante su uso para el tratamiento de heridas y dispositivos médicos diversos.

Al reducir la plata a nanopartículas es posible potencializar sus efectos antimicrobianos y desarrollar nuevas aplicaciones tecnológicas a partir de sus distintas propiedades. Se distinguen como nanopartículas de plata a partículas con dimensiones entre 1 y 100 nm, su uso en el tratamiento de heridas ha sustituido el empleo de sulfadiazina de plata. Adicionalmente, compañías de prestigio mundial han iniciado la

comercialización de electrodomésticos con superficies integradas con materiales a base de nanopartículas de plata conocido como Nano Silver™ con propósitos antimicrobianos. Del mismo modo, sus propiedades fisicoquímicas han alcanzado el área de imagenología clínica incluidas en técnicas espectroscópicas.

El aumento o disminución de la dimensión de las nanopartículas de plata afecta significativamente su eficiencia y las propiedades que suelen presentar. Nanopartículas de 1 a 50 nm han mostrado buena eficiencia antimicrobiana mientras que solo aquellas de 1 a 10 nm han presentan capacidad anti viral frente al VIH preferentemente con la glicoproteína gp120.²³

2.8 MÉTODOS DE SÍNTESIS

Las interesantes propiedades de las nanopartículas de metales nobles prometen el continuo descubrimiento de novedosas técnicas que faciliten la aplicación de nuevos materiales y herramientas de diagnóstico para diversas problemáticas; es por ello que se han reportado diversos protocolos de preparación.¹

Las estrategias de síntesis de nanopartículas tienden a controlar el tamaño y la morfología de las nanopartículas: esferas, barras, discos, prismas, entre otras, y pueden clasificarse en dos aproximaciones (Figura 2). La primera, conocida como “top down”, mediante la cual se obtienen nanopartículas por desgaste de sólidos metálicos por molienda o erosión, y la segunda conocida como “bottom up”, mediante la cual se obtienen nanopartículas a partir de la agrupación átomos metálicos.

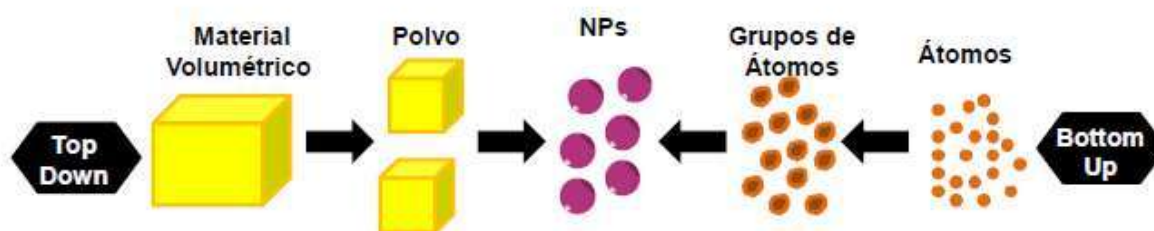


Figura 2. Representación gráfica de las dos estrategias de síntesis de nanopartículas.

La aproximación “bottom up” se basa en el mecanismo llamado “Ostwald ripening” donde se parte de una sal metálica y consiste en tres etapas:^{22, 24}

- Nucleación: El ion metálico (M^+) se reduce formando núcleos cerovalentes (M^0), generando pequeños agregados de átomos.

- Crecimiento: Los pequeños núcleos (M^0) se unen para aumentar el tamaño de las NPMs.
- Coagulación: Las NPMs se unen entre sí rápidamente dando lugar a agregados de mayor tamaño. Esta etapa es determinante para controlar el tamaño final de las NPMs, por lo que es necesaria la adición de agentes estabilizantes que detiene el proceso de coagulación en el momento indicado.

En general, estos procedimientos se pueden clasificar en tres grupos: métodos biológicos, métodos físicos y métodos químicos.

2.8.1 MÉTODOS BIOLÓGICOS

Las biosíntesis han surgido como una alternativa de síntesis más amigable con el medio ambiente. En estas metodologías se involucra el empleo de microorganismos^{17, 25} (bacterias, hongos y levaduras) o extractos de origen vegetal^{26, 27} para lograr la reducción de varios iones metálicos. Sin embargo, aun cuando los procesos biológicos son amigables con el ambiente, resultan ser procesos muy elaborados al involucrar una gran cantidad de pasos desde su inicio hasta la obtención de las nanopartículas, lo cual finalmente se traduce en un elevado costo de tiempo y dinero. Además es difícil asegurar la reproducibilidad de los experimentos dada la heterogénea composición (por ej. concentración de metabolitos) que los materiales biológicos normalmente presentan.

2.8.2 MÉTODOS FÍSICOS

Dentro de la clasificación de los métodos físicos, se incluyen los métodos electroquímicos, ablación láser,²⁸ termólisis, irradiación con microondas²⁹ y la síntesis sonoquímica.³⁰ En general, los métodos antes mencionados involucran la descomposición de sólidos metálicos mediante la aplicación de fuentes energéticas potentes o tratamientos térmicos que favorecen la nucleación de las partículas, en algunos casos recurriendo a atmósferas de gas inerte.¹

2.8.3 MÉTODOS QUÍMICOS

Destaca como el método más empleado la reducción química de sales metálicas en soluciones. De acuerdo con algunos autores, la reducción química provee la posibilidad de controlar adecuadamente el tamaño, la distribución y forma de las nanopartículas. En este caso el agente reductor puede ser el mismo disolvente o puede ser adicionado a la solución; entre los agentes reductores mayormente empleados destacan el borohidruro de sodio, la hidrazina y la dimetilformamida, sin dejar a un lado el empleo de sustancias no tóxicas que

presentan la misma efectividad, tales como el citrato de sodio, el almidón o la glucosa.^{1, 31, 32}

Otros métodos químicos de reciente auge son la reducción radiolítica y fotoquímica. El primero, involucra la exposición de las muestras acuosas a rayos gama de alta energía, lo que resulta en la formación de electrones solvatados, radicales OH[•] y átomos de hidrógeno, donde los radicales OH[•] actúan como radicales reductores.⁶

La reducción fotoquímica o fotólisis es una técnica relativamente simple, efectiva y limpia para la generación de partículas metálicas en sistemas coloidales. Al aplicar radiación ultravioleta a las soluciones acuosas se induce la fotooxidación del medio por la excitación de los iones metálicos presentes, resultando la formación de átomos metálicos y concluyendo en la formación de nanopartículas.^{33, 34}

2.8.3.1 REDUCCIÓN QUÍMICA FOTOINDUCIDA

Los métodos de síntesis de nanopartículas basados en la reducción química ofrecen diversas ventajas como menor tiempo de síntesis y mayor monodispersidad sobre aquellos procesos desarrollados por los protocolos biológicos. No obstante, el progreso de una reducción química tradicional puede llegar a ser costosa o requerir el uso de sustancias tóxicas para su desarrollo, representando un riesgo para el ambiente. Otro aspecto a considerar es las fuentes energéticas que se necesitan para inducir el proceso.

Por otra parte, los métodos de síntesis mediante reducción química calificados como “biosíntesis” y por consiguiente catalogados como procedimientos “verdes” requieren tiempos mayores, lo que posibilita la obtención no uniforme de las nanopartículas finales, siendo este el principal obstáculo a superar.

Concientizando las limitaciones de cada versión de reducción química y priorizando la disminución de la contaminación hacia el ambiente, resulta imperioso lograr el desarrollo de estrategias que además de ser económicas y eficientes optimicen también el uso de la energía requerida, como lo son los métodos de reducción fotoinducida. Estos procesos son cada vez más populares porque favorecen la reducción controlada de iones metálicos sin necesidad de utilizar concentraciones excesivas del agente reductor. Así se minimiza la presencia de subproductos peligrosos en el material final, tomando ventaja del uso de fuentes de energía limpia y renovable, como por ejemplo la luz solar, en este tipo de preparaciones en solución la radiación es absorbida de manera uniforme.³⁵⁻³⁹

La síntesis de NPMs mediante procesos de fotoreducción asistida con luz solar provee muchas ventajas sobre los procesos establecidos en las metodologías físicas y

químicas tradicionales cuando se realizan en presencia de agentes estabilizantes biocompatibles. Estos últimos pueden ser de carácter proteico o polimérico, principalmente.

La disminución de subproductos y del consumo de energías artificiales para la reducción química de sales metálicas a nanopartículas metálicas ha sido uno de los objetivos centrales del sector científico. La preparación en soluciones poliméricas representa una estrategia eficiente para la reducción de reactivos, siendo el propio polímero un componente multifuncional para el proceso. Sin embargo, el consumo energético continúa siendo un factor importante a considerar al implicar el gasto de energías no renovables y generando un costo adicional.

En la última década se ha recurrido al uso de radiación solar como fuente energética, disminuyendo de esta forma el costo de la síntesis de nanopartículas y en su caso de los compósitos generados *in situ*. Con anterioridad se han preparado compósitos de CTS/NPMs empleando radiación solar como fuente energética bajo diferentes condiciones.^{34, 40, 41}

A su vez, existen reportes del uso de polímeros como la PEO, PVA⁴² y el quitosano⁴³ en donde se ha evaluado su capacidad como agentes reductores para la preparación de nanopartículas metálicas, sin embargo, se ha reportado la necesidad de recurrir a agentes reductores o fuentes energéticas adicionales para la preparación de compósitos CTS/AgNPs mediante procedimientos fotoinducidos con radiación solar.⁴ Además, estudios comparativos que evalúen detalladamente la capacidad reductora de polímeros con distinta naturaleza química siguen sin ser estudiados en detalle.

2.8.3.2 IMPORTANCIA DEL AGENTE REDUCTOR

Al ser la reducción química el método más empleado en la síntesis de NPMs, es importante conocer la influencia de los agentes reductores que son empleados bajo las distintas modalidades de reducción. Históricamente, el primer reporte sobre la reducción química de sales de metales de transición para generar coloides metálicos cero-valentes fue publicado por Faraday en 1857. Siendo Turkevich quien estableció el mecanismo estándar para la obtención de coloides de oro por reducción de AuCl_4^- con citrato de sodio. Bajo esta modalidad se han ideado métodos de síntesis que involucran distintos agentes reductores como hidruros o sales (borohidruro de sodio, citrato de sodio), hidracina, o incluso disolventes oxidables como los alcoholes y algunos polímeros como: polietilenglicol, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, almidón, quitosano, entre otras, donde las reducciones son inducidas por tratamiento térmico-mecánico o irradiaciones de microondas, ultravioleta, entre otras.⁴⁴

El mecanismo de formación de nanopartículas se basa en primera instancia en la reducción del precursor metálico al correspondiente átomo metálico; la distribución del

tamaño en los coloides metálicos varía significativamente con los tipos y concentraciones de los agentes reductores usados en la síntesis, es decir, un agente reductor fuerte promueve una velocidad de reacción acelerada, favoreciendo así la formación de nanopartículas de dimensiones más pequeñas; mientras que un agente reductor de bajo potencial induce una velocidad de reacción lenta, favoreciendo entonces la formación de nanopartículas de mayor dimensión además de promover la formación continua de nuevos núcleos que resultan en una amplia distribución de tamaños de partícula.

De esta forma destaca la importancia de la naturaleza del agente reductor empleado en la síntesis, ya que el tamaño y forma de las nanopartículas repercute directamente en sus propiedades electrónicas, ópticas, magnéticas, mecánicas y en algunos casos antimicrobianas, lo que determina sus aplicaciones finales.

2.8.3.3 POLÍMEROS EMPLEADOS EN LA SÍNTESIS DE NPMs

El aspecto de mayor importancia en el proceso de síntesis de NPMs en solución polimérica es sin duda la estabilidad química de las mismas, la cual es proporcionada por la presencia del polímero que actúa como estabilizante. Helcher, en 1718 estudió la estabilidad de partículas de oro con el polímero natural almidón, estableciendo el primer antecedente del uso de polímeros como estabilizantes. Actualmente es común la síntesis de nanopartículas en medios poliméricos debido a que permiten el control de la morfología de las mismas⁴⁵ y por ende existe un mayor control sobre las propiedades finales. Entre los polímeros más comúnmente usados se encuentran el alcohol de polivinilo (PVA),⁴⁶ la polivinilpirrolidona (PVP)⁴⁷ y el polietilenglicol (PEG),⁴⁸ entre otros.

El uso de soluciones poliméricas como estabilizantes ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, en los últimos años han ganado relevancia este tipo de preparaciones puesto que también son accesibles para la obtención en un solo paso de materiales compuestos polímero/nanopartículas metálicas por la reducción de las correspondientes sales metálicas disueltas en la solución polimérica que finalmente será la matriz del compuesto; constituyendo así un procedimiento sencillo que favorece la obtención del compuesto en un periodo muy corto de tiempo.

Para que un soporte o matriz estabilizadora funcione óptimamente, es conveniente, que contenga grupos con pares de electrones libres, entre los que han sido temática de múltiples estudios destacan los grupos: -OH, -CN, -SH y -NH₂; que proporcionan estabilidad a las nanopartículas en etapas tempranas de formación.⁴⁹

De esta forma, la síntesis de NPMs mediante la reducción química con diferentes agentes reductores en soluciones de polímeros no es una estrategia nueva, no obstante,

resulta bastante útil por la posibilidad de controlar las características físicas finales de las nanopartículas simultáneamente a la obtención del material híbrido listo para procesar.

Es debido a la naturaleza química, no tóxica, biocompatible y biodegradable que caracteriza a los biopolímeros como el PVA y el CTS que resultan factibles para la producción de NPMs en solución⁵⁰, presentando prometedoras aplicaciones biomédicas en la forma final del material compuesto.

2.9 POLÍMEROS COMO AGENTES REDUCTORES

La preparación *in situ* de nanopartículas en soluciones poliméricas facilita la obtención de nuevos y mejores materiales aplicables a diversos sectores de la industria. En todas las metodologías de reducción química el común denominador es el empleo de soluciones poliméricas a manera de estabilizantes, sin embargo, el potencial que presentan la mismas soluciones poliméricas como agentes reductores oferta múltiples ventajas para la obtención en un solo paso de este tipo de compósitos.

En las metodologías que han reportado el uso de polímeros como reductores únicos o adicionales se enlistan la poliacrilamida (PAM),⁵¹ el ácido poliacrílico (PAA),⁵² el poliacrilonitrilo (PAN),⁵³ el óxido de polietileno (PEO), óxido de polipropileno (PPO),⁵⁴ la polivinilpirrolidona (PVP),⁷ el quitosano (CTS)⁵⁵⁻⁵⁷ y el alcohol polivinílico (PVA),⁵⁸ entre otros.

El empleo de soluciones de polímeros como agentes reductores permite contribuir a la disminución del número de reactivos empleados en estas síntesis químicas, lo que además de representar una ventaja económica, también contribuye a la preservación del medio ambiente.

Como se ha venido mencionando, la preparación de materiales híbridos polímero/NPMs trae consigo la posibilidad de nuevos materiales con importantes aplicaciones. La preparación *in situ* de NPMs en soluciones poliméricas facilita la obtención de estos materiales, además de que permite prescindir de agentes estabilizantes y dispersantes adicionales al polímero. En años anteriores, se ha hecho evidente la capacidad de reducción de los grupos $-NH_2$, $-COOH$, $-OH$ presentes en las cadenas centrales de los polímeros, lo que perfila a la reducción química dentro de las metodologías de la Química Sustentable al disminuir el consumo de reactivos y la generación de subproductos.⁶ La investigación sobre la capacidad de reducción del quitosano y el alcohol de polivinilo ha sido un hecho constante en donde la obtención de los compósitos finales en forma de biopelículas⁴ y colecciones de nanofibras se logra con gran éxito con la ayuda o no del proceso de electrospinning.^{5, 6, 38}

2.9.1 COMPÓSITOS QUITOSANO/NPMs

Las excelentes características del polímero natural quitosano han inspirado el desarrollo de novedosos materiales con nanopartículas de metales como el oro y la plata, donde el quitosano resulta ser un adecuado soporte para el material compuesto final.

Las combinaciones con nanopartículas de oro han arrojado interesantes resultados en cuanto a nuevas herramientas para el diagnóstico y terapia de algunas enfermedades, terapia fototérmica, sistemas de liberación controlada de fármacos y para la obtención de mejores imágenes de tejidos y tumores.⁵⁹ En los últimos años también se ha ahondado en el uso de nanopartículas de oro para la producción de materiales antibacterianos^{7, 60} y para la constitución de superficies anticoagulantes.⁶¹

Por su parte, los compósitos de quitosano/nanopartículas de plata no representan una combinación novedosa, no obstante durante varios años se han desarrollado distintas investigaciones con miras al descubrimiento de nuevas aplicaciones, siendo las más relevantes el revestimiento de heridas con propiedades antimicrobianas,^{58, 62} la actividad antiviral contra virus como el VIH, A H1N1, herpes simple y hepatitis.⁶³

2.9.2 COMPÓSITOS ALCOHOL POLIVINÍLICO /NPMs

Las propiedades del alcohol de polivinilo resultan interesantes para el desarrollo de materiales híbridos, las combinaciones con nanopartículas de oro y plata resultan obvias dadas las propiedades biomédicas que ambos componentes presentan de manera aislada.

Entre las aplicaciones de mayor estudio para las combinaciones PVA/AuNPs destacan: los sistemas de liberación de fármacos, en donde es posible la liberación simultánea y controlada de dos fármacos para terapias combinadas, la inmuno-señalización de anticuerpos específicos para la detección de tejidos tumorales,⁸ así como el diseño de membranas con actividad antimicrobiana para la protección de heridas expuestas⁶⁴ e inmunosensores electroquímicos.⁶⁵

A su vez, las combinaciones de PVA/AgNPs se han enfocado en su mayoría al desarrollo de materiales de recubrimiento de heridas y para la obtención de andamios para el cultivo de células con el propósito de lograr la regeneración tisular.⁶⁶⁻⁶⁹

2.10 OBTENCIÓN DE NANOFIBRAS

Una presentación altamente deseable de los materiales avanzados polímero/NPMs son las nanofibras; definiéndose como nanofibra a la colección de fibras ultra finas que individualmente no exceden los 500 nm de diámetro. Los materiales compuestos del tipo polímero/NPMs pueden ser procesados hasta la obtención de nanofibras dada la

versatilidad fisicoquímica que caracteriza a cada polímero, en general, estas nanoestructuras tridimensionales representan fascinantes alternativas para la solución de diversas problemáticas a nivel tecnológico e industrial dentro de muy variadas disciplinas. Las propiedades de estos materiales compuestos, están intrínsecamente ligadas a las dimensiones nanométricas que ostentan y que a su vez les confiere una mayor superficie de contacto por unidad de área.

Los materiales compuestos en forma de nanofibras pueden ser producidos mediante distintas metodologías, destacando entre sus cualidades únicas las estructuras con alta porosidad, las novedosas aplicaciones y sus propiedades mecánicas, físicas y químicas. La obtención final de nanofibras puede darse por distintas rutas: drawing, separación de fase, auto-ensamblado, síntesis en molde, blowing y electrospinning, entre otros, sin embargo el electrospinning es la técnica más empleada para la producción de nanofibras debido a que resulta ser la opción más económica y versátil para el procesamiento de una amplia gama de materiales.⁷⁰

2.10.1 ELECTROSPINNING

El método de electrospinning transforma las soluciones poliméricas en micro y nanofibras continuas; los elementos requeridos incluyen una fuente de suministro de la solución polimérica, una fuente de alto voltaje y un colector, tal y como se describe en la Figura 3. Todo proceso que produce nanofibras involucrando un campo eléctrico se denomina electrospinning.

La recolección de las fibras se realiza directamente en un colector metálico que puede ser estático, giratorio o algún tipo de molde, produciendo redes nanoporosas no tejidas; el fundamento del electrospinning deriva del cambio generado en el potencial eléctrico. El proceso tiene lugar cuando a través de una aguja electrificada con un voltaje entre 5 y 30 kV se hace pasar la solución polimérica, la solución cargada eléctricamente forma la estructura conocida como cono de Taylor que es una elongación en la punta de la aguja (ver Figura 3). El colector es el electrodo complementario que atrae a la solución a partir del cono de Taylor, cuando la diferencia electrostática logra vencer a la tensión superficial se produce el jet del polímero que se precipita hacia el colector metálico mientras que el solvente es evaporado durante el trayecto, finalmente la solidificación del jet en el colector da lugar a la colección de nanofibras.

Para la alineación de las fibras es posible emplear distintas configuraciones como colecciones de discos, distinta colocación de electrodos, tambores giratorios y ejes motorizados; además, la técnica es versátil para el procesado de distintas soluciones en

múltiples agujas para enriquecer el andamio así como la inyección de sustancias bioactivas.^{70, 71}

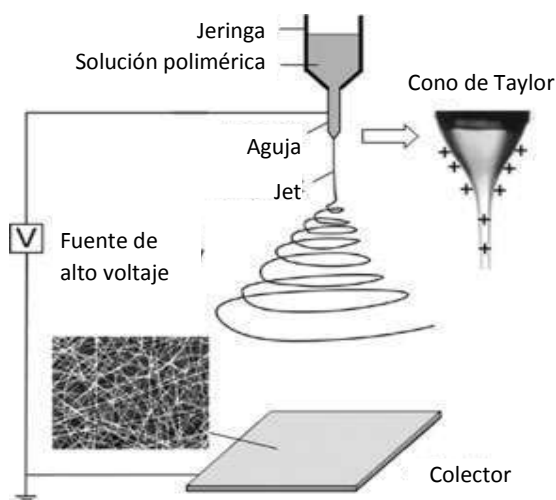


Figura 3. Ilustración de la configuración básica para electrospinning, modificada de la ref. 72.

2.10.2 PARÁMETROS DE PROCESAMIENTO MEDIANTE ELECTROSPINNING

Los parámetros de trabajo son muy importantes para entender no sólo la naturaleza de la técnica del electrospinning, sino también el proceso de conversión de las soluciones poliméricas a nanofibras. Estos parámetros se pueden clasificar en tres grupos: parámetros de la solución, parámetros del proceso y parámetros ambientales.

Cada uno de estos parámetros puede afectar la morfología de las fibras, de tal forma que el adecuado control de los parámetros favorece la obtención de nanofibras con la morfología deseada y el diámetro controlado.^{72, 73}

2.10.2.1 PARÁMETROS DE LA SOLUCIÓN

Concentración

La concentración del polímero se elige dependiendo su peso molecular; así, la concentración del polímero desempeña un papel importante en la formación de las nanofibras durante el proceso de electrospinning. Concentraciones muy bajas dan lugar a la formación de micro partículas del polímero; además de favorecerse el proceso de electrospray en lugar de electrospinning dada la baja viscosidad y alta tensión superficial de la solución. Esta concentración inadecuada da lugar a la generación de perlas a lo largo de la fibra nanométrica, las cuales no son deseables y se consideran como defectos.

Peso Molecular

El peso molecular del polímero también ejerce un efector importante en la morfología de las fibras electrohiladas. Cuando se trabaja con polímeros de bajo peso molecular se promueve la formación de perlas en lugar de la nanofibra lisa, por ende el aumento del peso molecular del polímero dará lugar a nanofibras con menos defectos a una concentración dada. El alto peso molecular favorece la formación de nanofibras incluso a baja concentración.

Viscosidad

La viscosidad de la solución a electrohilar es un factor clave para la determinación de la morfología de la fibra. Es un hecho evidente que a bajas viscosidades no es posible la obtención de nanofibras continuas y de morfología homogénea, mientras que las concentraciones muy altas del polímero también presentan dificultades para el procesamiento. Tanto la concentración como el peso molecular del polímero se relacionan con la viscosidad de la solución, por ello, la viscosidad de la solución a procesar puede modificarse ajustando la concentración del polímero. En las soluciones que presentan baja viscosidad, la tensión superficial es el factor dominante y como resultado se obtienen nanofibras con perlas, por el contrario, cuando se manejan viscosidades adecuadas la nano-red generada se compone de fibras continuas con diámetros homogéneos.

Tensión Superficial

La tensión superficial, en función de la composición del disolvente en la solución polimérica, es un factor muy importante en el proceso de electrospinning. Cada disolvente influye de manera distinta sobre la tensión superficial de la solución polimérica, de tal forma que al cambiar de disolvente se puede mejorar la morfología de las nanofibras evitando la formación de perlas a lo largo de las nanoestructuras. La tensión superficial y la viscosidad de una solución pueden ajustarse modificando la proporción de los disolventes.

Conductividad

El tipo de polímero, disolvente y la presencia de sales disueltas determinan la conductividad de la solución. El proceso de electrospinning exige que la solución sea de naturaleza iónica para que pueda fluir en el campo eléctrico de la aguja al colector. Si una solución no es suficientemente conductora, las fibras pueden no formarse. Así pues, la conductividad puede ser alterada modificando al polímero, empleando otro disolvente o por la inclusión de aditivos tales como sales. Típicamente, la conductividad de la solución será difícil de modificar sin alterar otras características de la solución. En tales situaciones, puede ser más factible alterar la intensidad del campo eléctrico, el caudal de la solución u otras propiedades del material para lograr su procesado. El uso de grandes cantidades de

sales puede causar un aumento en la viscosidad de la solución y afectar la tensión superficial de la misma.

2.10.2.2 PARÁMETROS DEL PROCESO

Voltaje

En lo que concierne al proceso de electrospinning, el voltaje aplicado es el factor crucial, debiendo ser suficiente para cargar electrostáticamente al jet eyectado del cono de Taylor. Sin embargo, la repercusión que puede tener en el diámetro y morfología de las fibras es controversial y está sujeto a investigaciones más especializadas en el tema.

Velocidad de Flujo

El flujo másico de la solución que se procesa es otro parámetro de cuidado. Generalmente, se recomienda trabajar con velocidades de inyección bajas para dar tiempo suficiente a la polarización de la solución. Cuando se manejan velocidades o flujos altos se compromete la adecuada formación de nanofibras promoviendo la aparición de perlas en la estructura electrohilada además de acortar el tiempo de secado en el colector.

Colector

El colector desempeña la función de sustrato conductivo, siendo la base que finalmente constituye la estructura electrohilada. Comúnmente se emplean estructuras de aluminio como colectores y éstas han sido diseñadas en diversas formas: tamices, rejas, alfileres, barras paralelas o enrejadas, tambores giratorios, entre otros. La importancia del tipo de colector reside en el acomodo que se desee obtener en la nanofibra final ya que actuará como soporte de la colección de nano-hebras generadas.

Distancia Colector-Aguja

El espacio existente afecta directamente el diámetro y la morfología de las fibras de tal forma que si la distancia es muy corta el jet no tendrá el tiempo suficiente para solidificar antes de llegar al colector dando origen a una red polimérica en lugar de las nanofibras deseadas. Al aumentar la distancia entre la aguja y el colector debe considerarse que a medida que se incrementa la distancia el campo eléctrico se debilita.

2.10.2.2 PARÁMETROS AMBIENTALES

Los factores ambientales que también pueden afectar la morfología de las fibras son la temperatura y la humedad. Las altas temperaturas favorecen la formación de nanofibras más delgadas.

A su vez, la baja humedad ayuda al secado de la fibra incrementando la velocidad de evaporación del solvente, por el contrario, la alta humedad del ambiente dará lugar al

engrosamiento del diámetro debido a la posibilidad de neutralización de las cargas del jet y la disminución de las fuerzas de estiramiento.⁷⁰⁻⁷³

2.11 APLICACIONES DE LOS MATERIALES COMPUESTOS POLÍMERO/NPMs

Las aplicaciones de los nanomateriales compuestos polímero/NPMs en una dimensión ganan interés para su aplicación en el entorno ambiental para la filtración de aire y agua, así como en los avances para el diseño de nuevos dispositivos electrónicos y fotónicos. Sin embargo, en el campo de la medicina presentan especial interés para la distribución controlada de fármacos, ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.⁷⁴

2.12 ENSAYOS DE BIOCMPATIBILIDAD Y EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD

El uso generalizado de las NPMs trae consigo el riesgo de la exposición crónica a niveles crecientes de estos materiales, lo cual exige el conocimiento profundo de los posibles efectos adversos que pueden repercutir en organismos vivos. La miniaturización de los materiales a nanoescala, no solo afecta sus propiedades físicas sino también su toxicidad, en comparación con sus contrapartes macroscópicas. Las NPMs muestran una alta área de superficie, lo que aumenta la exposición y el nivel de interacción del material con su entorno inmediato.

A pesar de las innumerables ventajas que trae consigo la aplicación de nanomateriales al campo de la medicina resulta controversial la seguridad del tejido vivo expuesto a estos materiales, siendo rutas posibles de exposición: la inhalación, absorción gastrointestinal o contacto dérmico, representando amenazas cuando alcanzan el torrente sanguíneo, el bazo, la médula ósea, el sistema nervioso o los órganos excretores y tejidos, así como la posible absorción en algunos organelos celulares como las mitocondrias y el núcleo. Este último es un organelo de fácil acceso dadas las diminutas dimensiones que presentan las NPMs.⁷⁵

Recientemente, varios estudios han indagado en la inducción de autofagia como un efecto citotóxico. Con el propósito de dilucidar la polémica existente, se ha analizado la citotoxicidad ejercida por las nanopartículas de metales nobles sobre diversas líneas celulares siendo notoria la influencia de la forma, el tamaño, la concentración y el tiempo de exposición, así como los estabilizantes empleados o agentes de recubrimiento. Algunas investigaciones han demostrado que la citotoxicidad de las NPMs es un resultado multifactorial que involucra aspectos como: forma, tamaño, dosis suministrada, tiempo de exposición e incluso el tipo de célula en estudio.⁷⁶

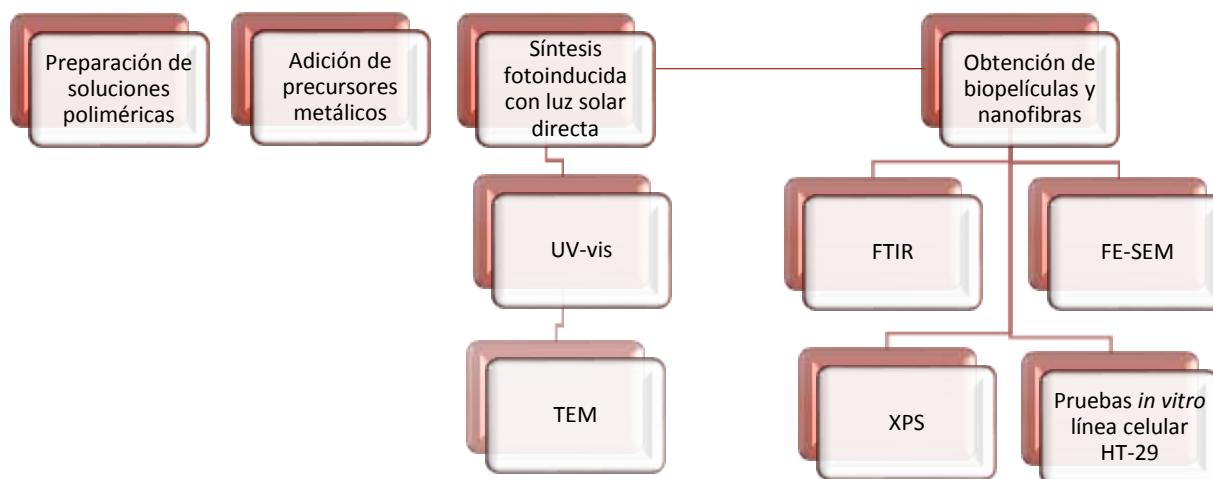
Los ensayos *in vitro* han expuesto la marcada citotoxicidad que presentan las AuNPs de 1 a 4 nm de diámetro promedio frente a células de tejido conectivo, epiteliales, macrófagos y células de melanoma, mientras que aquellas de 15 nm en concentraciones de 6.3 mg/mL no resultan citotóxicas en las mismas líneas celulares. A su vez, es destacable la capacidad de proliferación que ejercen las AuNPs de 45 nm (0.02 mg/mL) en cultivos de fibroblastos dérmicos humanos, y de 18 nm (0.1 mg/mL) en células inmortales de leucemia mieloide K562. Mientras que estudios en macrófagos RAW264.7 han demostrado que concentraciones variables de hasta 100 mM en los cultivos no resultan citotóxicas ni causan respuesta inflamatoria inducida por estrés.⁷

A su vez, se ha evaluado la citotoxicidad de AgNPs frente a diversas líneas celulares humanas, encontrándose una adecuada viabilidad en los cultivos de células embrionarias de riñón expuestas a AgNPs de 20 nm de diámetro (1 mg/mL),⁷⁷ de la misma forma concentraciones de 1070 ppm de AgNPs en geles de CTS no afectan el crecimiento, la morfología o la actividad metabólica de fibroblastos humanos.⁷⁸ AgNPs de 10 nm no evidencian datos de citotoxicidad a concentraciones microbicidas frente a células procedentes de glioma U251 y fibroblastos pulmonares IMR-90, así como concentraciones variables de AgNPs de 20 nm (0.1-10 μ M) en macrófagos RAW264.7.⁷⁹

Se han descubierto otros aspectos durante el desarrollo de los estudios de citotoxicidad, por ejemplo que la internalización celular de las NPMs es frecuentemente debida al agente estabilizante o recubrimiento que las acompaña, de tal forma que mediante distintos tratamientos es posible reducir la citotoxicidad de los compósitos o bien haciendo uso de biopolímeros como almidón, goma arábica,⁸⁰ gelatina,⁸¹ goma xantana, entre otros.⁸² Diferentes autores destacan la disminución de efectos citotóxicos de NPMs y sus compósitos cuando éstos provienen de una metodología verde o sustentable, donde los reductores químicos y/o estabilizantes en cuestión son inocuos o bien se trata de algún biopolímero.^{6, 79, 80} Por lo anterior, es destacable el estudio comparativo *in vitro* de materiales compuestos a base de CTS y PVA combinados con NPMs obtenidos mediante el método fotoinducido con radiación solar, los cuales presentan la ventaja de proceder de una metodología limpia.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología empleada para la síntesis y caracterización de los materiales compuestos polímero/MNPs se describe a través del diagrama de flujo presentado en el Esquema 2.



Esquema 2. Esquema de la metodología empleada.

3. 1 Síntesis de Nanopartículas Metálicas en Solución Polimérica

3.1.1 Precursores de Nanopartículas

AgNO₃: precursor químico de AgNPs

AgNO₃ de Sigma-Aldrich®, grado de pureza >99% y peso molecular de 169.87 g/mol, fue empleado como precursor de las AgNPs a concentraciones variables en las soluciones poliméricas desde 0.001 hasta 0.05 % p/v respecto del peso de la solución polimérica.

HAuCl₄: precursor químico de AuNPs

Para la obtención de AuNPs se empleó HAuCl₄ de Sigma-Aldrich®, con grado de pureza >99.9% y peso molecular de 393.83 g/mol, a concentraciones variables en las soluciones poliméricas desde 0.001 hasta 0.05 % p/v respecto al peso de la solución polimérica.

3.1.2 Soluciones Poliméricas Reductoras

Solución de PVA

Para la preparación de soluciones acuosas a concentraciones de 6, 7, 8 y 9 %p/v PVA, se empleó alcohol polivinílico, de Sigma-Aldrich®, con grado de hidrólisis >99%.

Solución de CTS

El quitosano, de Sigma-Aldrich®, con grado de desacetilación >75% se disolvió en solución de ácido acético al 1 % p/p, para obtener soluciones a concentraciones 0.5, 1, 1.5 y 2 % p/v.

3.1.3 Reducción Química

La reducción de los precursores en las soluciones poliméricas se llevó a cabo mediante un proceso fotoinducido por exposición a la radiación solar directa con tiempos de exposición variables, hasta establecer 30 minutos como tiempo necesario para la máxima reducción de las concentraciones metálicas en estudio. El proceso se realizó sin agitación y en ausencia de agentes reductores adicionales a la solución polimérica. De esta forma, cada uno de los polímeros desempeña el papel de agente reductor, estabilizante y matriz de los nanocompuestos generados *in situ* en cada caso, además de evitar la adición de dispersantes adicionales en el proceso.

La exposición a la radiación solar se realizó cuando la incidencia de IUV se mantiene fija en el factor 10 de la escala internacional, según datos del Servicio Meteorológico Nacional. Durante el tiempo de exposición se midió la absorbancia a diferentes tiempos en un espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10S de Thermo Scientific para monitorear la reducción de las sales metálicas y construir gráficas de progreso de la reducción química para cada concentración.

3.2 Procesamiento de los Compósitos Polímero/NPMs para la Obtención de Películas Delgadas y Nanofibras.

Películas delgadas

Una vez expuestas a la radiación solar y caracterizadas mediante espectroscopia UV-Vis, las soluciones de PVA-NPMs y CTS-NPMs fueron fácilmente transformadas en películas delgadas mediante el método de evaporación del solvente: para ello las soluciones se vertieron en cajas Petri de 60 y 100 mm y secadas a 60°C por 8 h en estufa Novatech H645-E0.

Nanofibras

Para la obtención de nanofibras, las soluciones fueron procesadas en el equipo de Electrospinning de NaBond Technologies Co. usando una bomba de inyección kdScientific LEGATO200, los parámetros de procesamiento del equipo de electrospinning fueron determinados para cada una de las soluciones mediante varios ensayos; con la ayuda de imágenes obtenidas mediante microscopia electrónica de barrido (FE-SEM, por sus siglas en inglés) se eligieron las condiciones de proceso adecuadas.

3.3 Microscopia Electrónica: FE-SEM y TEM

La morfología y calidad de las nanofibras fueron analizadas en el Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo Joel JSM-7600F del IIM-UMSNH, previo al análisis microscópico se realizó el metalizado de las mismas con iones Cu^+ . Las imágenes obtenidas facilitaron la determinación de los parámetros óptimos de procesamiento en el equipo electrospinning para la obtención de nanofibras de cada una de las soluciones.

La morfología y los diámetros promedio de las nanopartículas metálicas se calcularon a partir de las imágenes obtenidas en el Microscopio Electrónico de Transmisión Joel JEM-2010 con filamento de LaB_6 del CNyN-UNAM.

3.4 Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros de infrarrojo fueron obtenidos en el Espectrofotómetro Nicolet iS10 de Thermo Scientific usando la técnica de ATR de los compósitos en nanofibras y películas de diversas concentraciones.

3.5 Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

El análisis de superficie XPS se realizó en espectrómetro ESCALAB 250Xi de Thermo Scientific con monocromador de Al (XR15) operado a 20 eV. Las muestras a analizar fueron películas muy delgadas de compósitos PVA/NPMs 2 % p/v y CTS/NPMs 3 % p/v obtenidas por el mismo proceso con luz solar directa.

3.6 Ensayos de Solubilidad e Hinchamiento

Solubilidad

Los ensayos de solubilidad se realizaron con 10 mg de cada muestra en 1 mL de cada uno de los disolventes: agua destilada, solución inyectable (PISA[®]), así como los medios de crecimiento celular McCoy's 5A (Sigma-Aldich[®]) y DEMEM (ATCC[®]).

Hinchamiento

La capacidad de absorción de agua de los materiales en nanofibras y bioplículas de los compósitos polímero/NPMs se evaluó empleando alícuotas de 1 cm X 1 cm de dimensión, las cuales fueron inmersas en 3 mL de agua. El ensayo fue realizado bajo las mismas condiciones en medio de cultivo celular DEMEM (ATCC[®]).

3.7 Análisis de Biocompatibilidad *in vitro* en Línea Celular HT-29

Los análisis de compatibilidad y viabilidad/citotoxicidad de los compósitos obtenidos frente a células provenientes de adenocarcinoma colo-rectal (ATCC[®]HTB-38TM) se obtuvieron como

resultado de una estancia realizada en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) bajo la asesoría de la Dra. Sara Elisa Herrera Rodríguez. Previo a las pruebas *in vitro* se realizó la siembra de cultivos primarios en el medio McCoy's 5A de Sigma-Aldrich a 37°C, en atmósfera de 5% CO₂ durante 24 h siguiendo los protocolos que se incluyen en el apéndice B.

Los compósitos a evaluar fueron películas polímero/NPMs 0.05 % p/v, las cuales se neutralizaron previo a la siembra de células, siendo el protocolo siguiente: 30 unidades de material polimérico en forma de discos de 6 mm de diámetro se lavaron con 50 mL de NaHCO₃ 5 % p/v durante 5 minutos, posteriormente se realizaron 10 lavados con 25 mL de agua destilada y se corroboró el pH neutro de los lavados 8, 9 y 10 con tiras reactivas.

3.7.1 Adhesión Celular

Del cultivo primario se realizó la extracción de 100,000 células para los ensayos de adhesión celular empleando múltiples controles en placas de 96 pozos:

- (C+) Células en medio de crecimiento McCoy's 5A
- (C-) Medio de crecimiento McCoy's 5A
- (C_m) Compósito y medio de crecimiento McCoy's 5A
- (C_i) Medias lunas del compósito, células y medio McCoy's 5A

a) Ensayo de Azul de Toluidina

La evaluación de la adhesión se realizó mediante la tinción con el colorante azul de toluidina (Sigma-Aldrich), para ello se realizó la fijación de las células con paraformaldehído, se lavaron las muestras con agua bidestilada y se realizó la extracción del colorante con dodecilsulfato sódico (SDS, Sigma-Aldrich), finalmente se realizaron las medidas de absorbancia para la obtención de resultados mediante lecturas de densidad óptica en fotómetro de ELISA xMark a 600 nm.

b) Ensayo de Cristal Violeta

Para la validación del ensayo de adhesión con azul de toluidina, se evaluó de manera simultánea la adhesión de las células a los soportes poliméricos mediante la tinción con cristal violeta (Sigma-Aldrich), realizándose el mismo procedimiento antes descrito variando el colorante, finalmente se realizó la lectura de la densidad óptica de las muestras en fotómetro de ELISA xMark a 650 nm.

3.7.2 Viabilidad y Citotoxicidad Mediante el Ensayo MTT

La citotoxicidad de las células se realiza de manera simultánea con la evaluación de la viabilidad de las mismas como resultado de su actividad mitocondrial. El ensayo consiste en la evaluación de la actividad metabólica de las enzimas oxidorreductasas dependientes de NAD(P)-H, las cuales

son capaces de reducir a la sal incolora MTT (bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a formazán, su forma insoluble y colorida. Para la realización del ensayo se empleó el Kit de MTT suministrado por Sigma-Aldrich®. Tratándose de una reacción de degradación de sales de tetrazolio a formazán monitoreada mediante colorimetría, el análisis de los resultados se realizó a partir de mediciones de la densidad óptica de las muestras en fotómetro de ELISA a 570 nm.

4. RESULTADOS

La reducción de las sales metálicas (AgNO_3 y HAuCl_4) a núcleos cerivalentes se realizó en soluciones poliméricas (CTS y PVA) en ausencia de agentes reductores, dispersantes y estabilizantes adicionales al polímero en cuestión. Las condiciones ambientales durante el periodo de exposición a la luz solar directa se eligieron cuando el estado del tiempo se reportaba como *soleado* tomando en cuenta los siguientes parámetros ambientales: temperatura ambiente 20-25°C, nubosidad menor al 30%.

4.1 Influencia de la Concentración del Polímero Empleado Como Agente Reductor

La reducción inducida por exposición a la radiación solar se analizó empleando diferentes concentraciones de cada polímero y manteniendo fija la concentración del precursor metálico. Las Figuras 4 y 5 presentan los espectros de UV-Vis obtenidos de los compósitos preparados en PVA después de 30 min de exposición a la luz solar, en los conjuntos de espectros que se presentan en las Figuras 4a y 5a se aprecian las bandas del plasmón superficial a las longitudes de onda características: 530 nm para AuNPs y 410 nm para AgNPs, siendo evidentes los desplazamientos hipercrómicos ocasionados por el aumento de la concentración de metal reducido a NPMs como consecuencia del mayor efecto reductor a concentraciones mayores del polímero.

En los espectros de las soluciones de PVA (Figuras 4 y 5) puede apreciarse una mayor eficiencia en la reducción cuando la concentración de PVA es de 8 % p/v, las concentraciones de PVA superiores al 8 % p/v dificultan la dispersión y adecuada reducción del metal en cuestión, además de que el mayor ancho de la banda a concentraciones mayores del 8 % p/v denota mayor distribución de tamaño de partícula, lo que implica una mayor diversidad de tamaño. Asimismo, en la reducción de la sal de plata (Figura 5) se registra un drástico desplazamiento batocrómico indicativo de tamaño de partícula mayor, lo cual ha sido posible verificar mediante microscopia electrónica de transmisión, resultado que se muestra en la Tabla 1. Es así que la concentración óptima de PVA en solución acuosa para reducción de las concentraciones de las sales metálicas empleadas en esta investigación es de 8% p/v.

Las imágenes de TEM obtenidas de los compósitos PVA/NPMs confirman que las soluciones PVA 8 % p/v presentan mayor capacidad de reducción y brindan mayor estabilidad a las NPMs generadas mediante el proceso fotoinducido, estas nanopartículas presentan morfología esférica y diámetros uniformes en contraste con la irregular morfología y dimensión que presentan las nanopartículas sintetizadas en PVA al 9 % p/v (Tabla 1).

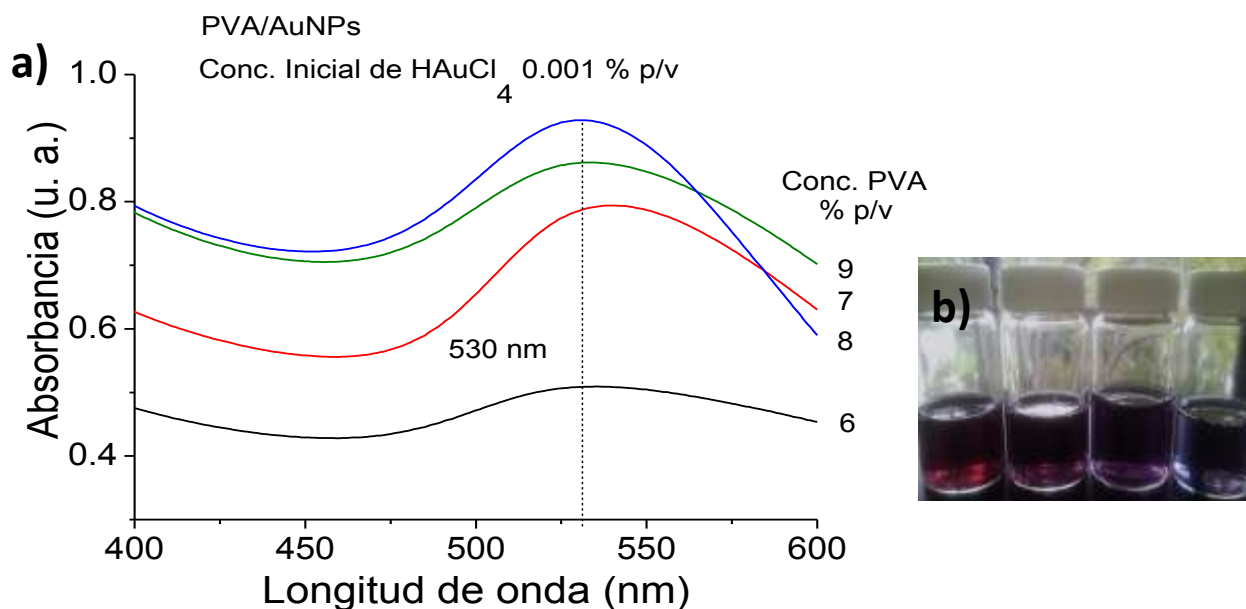


Figura 4. a) Espectro de UV-Vis de los compósitos PVA/AuNPs; b) Compósitos PVA/AuNPs diferente concentración de PVA: 9, 8, 7 y 6 % p/v izquierda a derecha.

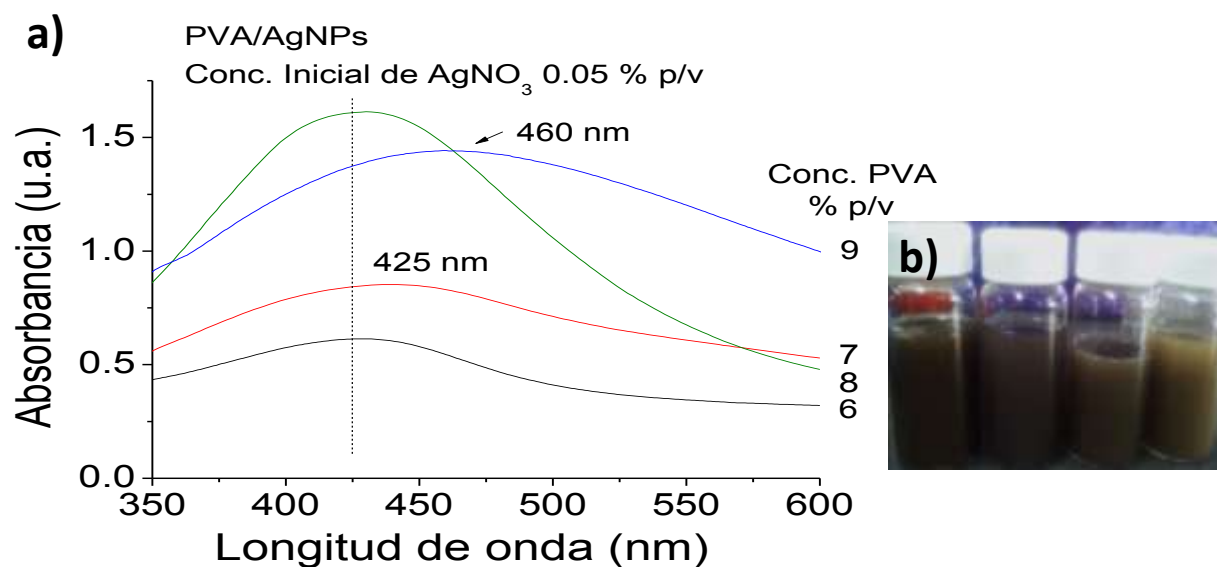
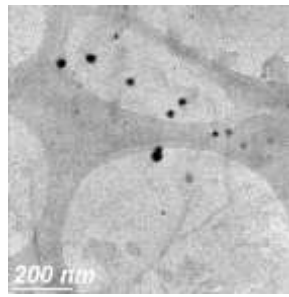
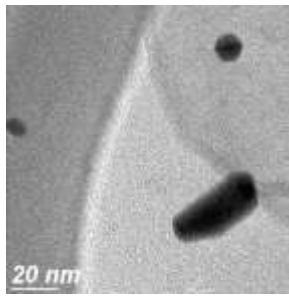
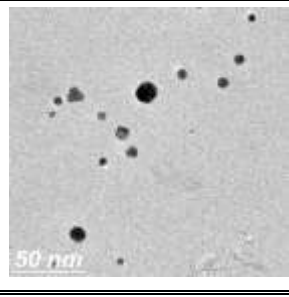
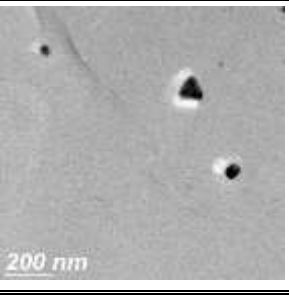
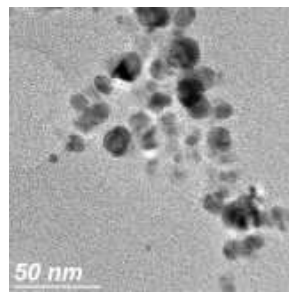
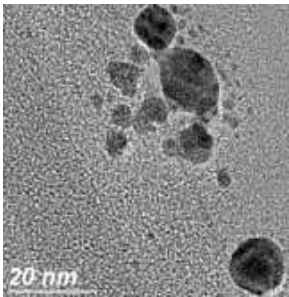
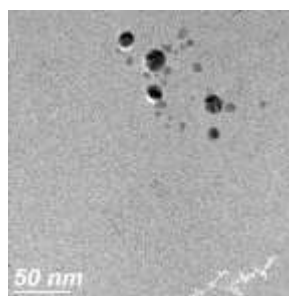
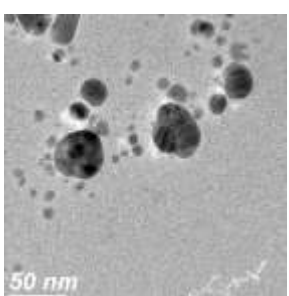


Figura 5. a) Espectro de UV-Vis de los compósitos PVA/AgNPs; b) Compósitos PVA/AgNPs diferente concentración de PVA: 9, 8, 7 y 6 % p/v izquierda a derecha.

Tabla 1. Cuadro comparativo de compósitos polímero/NPMs respecto de la concentración de la solución polimérica.

CARACTERÍSTICAS	IMAGEN DE TEM	IMAGEN DE TEM	CARACTERÍSTICAS
PVA 8 % p/v/AuNPs (HAuCl ₄ 0.05 % p/v)		PVA 9 % p/v/AuNPs (HAuCl ₄ 0.05 % p/v)	
RPS λ = 530 nm Esféricas con diámetros homogéneos: 12 nm DS= 2.8			RPS λ = 534 nm Irregulares con diámetros variables: 10-20 nm DS= 6.6
CTS 1.5 % p/v/AuNPs (HAuCl ₄ 0.01 % p/v)		CTS 1 % p/v/AuNPs (HAuCl ₄ 0.01 % p/v)	
RPS λ = 522 nm Esféricas con diámetros homogéneos: 8 nm DS= 2.9			RPS λ = 525 nm Irregulares con diámetros variables: 20-80 nm DS= 10.7
PVA 8 % p/v/AgNPs (AgNO ₃ 0.05 % p/v)		PVA 9 % p/v/ AgNPs (AgNO ₃ 0.05 % p/v)	
RPS λ = 425 nm Esféricas con diámetros homogéneos: 17 nm DS= 2.0			RPS λ = 460 nm Esféricas con diámetros variables: 8-20 nm DS= 4.5
CTS 1.5 % p/v/AgNPs (AgNO ₃ 0.01 % p/v)		CTS 1 % p/v/AgNPs (AgNO ₃ 0.01 % p/v)	
RPS λ = 416 nm Esféricas con diámetros homogéneos: 15 nm DS= 2.3			RPS λ = 425 nm Irregulares con diámetros variables: 15-50 nm DS= 9.8

Las soluciones de CTS empleadas como agentes reductores presentan una tendencia similar, es decir, el proceso de reducción es favorecido con el aumento de concentración del polímero hasta alcanzar la concentración de 1.5 % p/v; las concentraciones de CTS de 2 % p/v o superiores dificultan la adecuada dispersión de la sal metálica. Por tanto, para el estudio de la preparación de nanopartículas en solución de quitosano, 1.5 % p/v del polímero resulta ser la concentración más adecuada al ejercer mejor capacidad de reducción como se puede apreciar en los espectros de las Figuras 6 y 7.

De la misma forma, las imágenes de TEM obtenidas de los compósitos CTS/NPMs confirman la mayor capacidad reductora de las soluciones 1.5 % p/v al generar NPMs esféricas de diámetros uniformes a diferencia de los compósitos preparados en CTS 1 % p/v en los cuales se aprecian morfologías irregulares y diámetros variables (Tabla 1). Esto es evidenciado en los espectros UV-Vis al mostrar mayor amplitud de las bandas correspondientes así como desplazamientos en la longitud de onda que son congruentes con la mayor distribución en el tamaño de las nanopartículas que se observa en las micrografías.

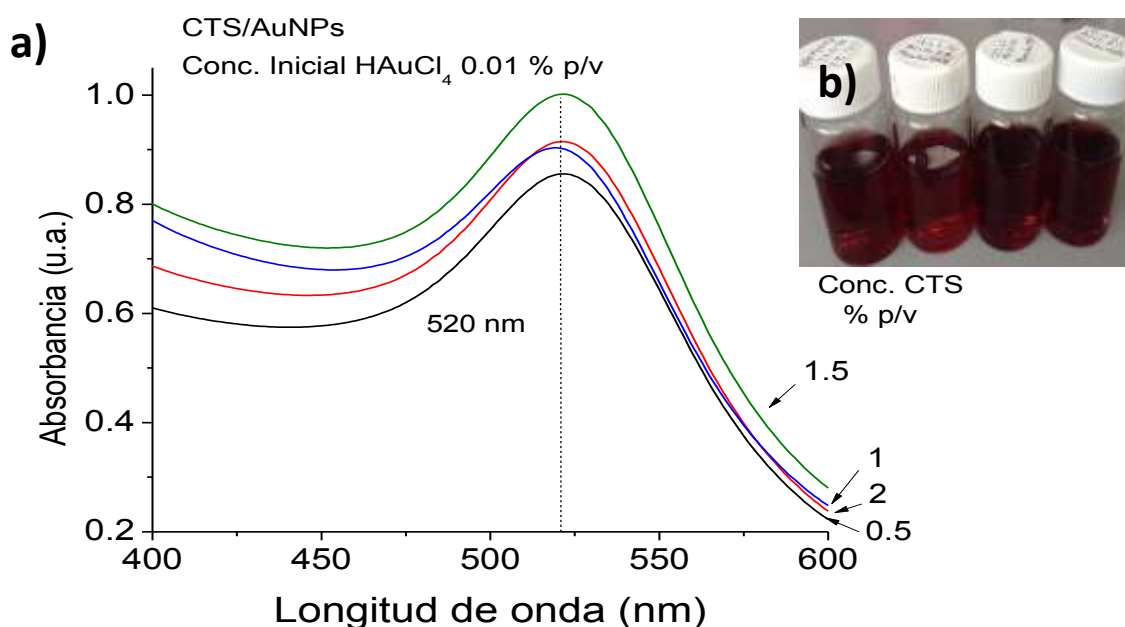


Figura 6. a) Espectro de UV-Vis de los compósitos CTS/AuNPs; b) compósitos CTS/AuNPs diferente concentración de CTS: 0.5, 1, 1.5 y 2 % p/v izquierda a derecha.

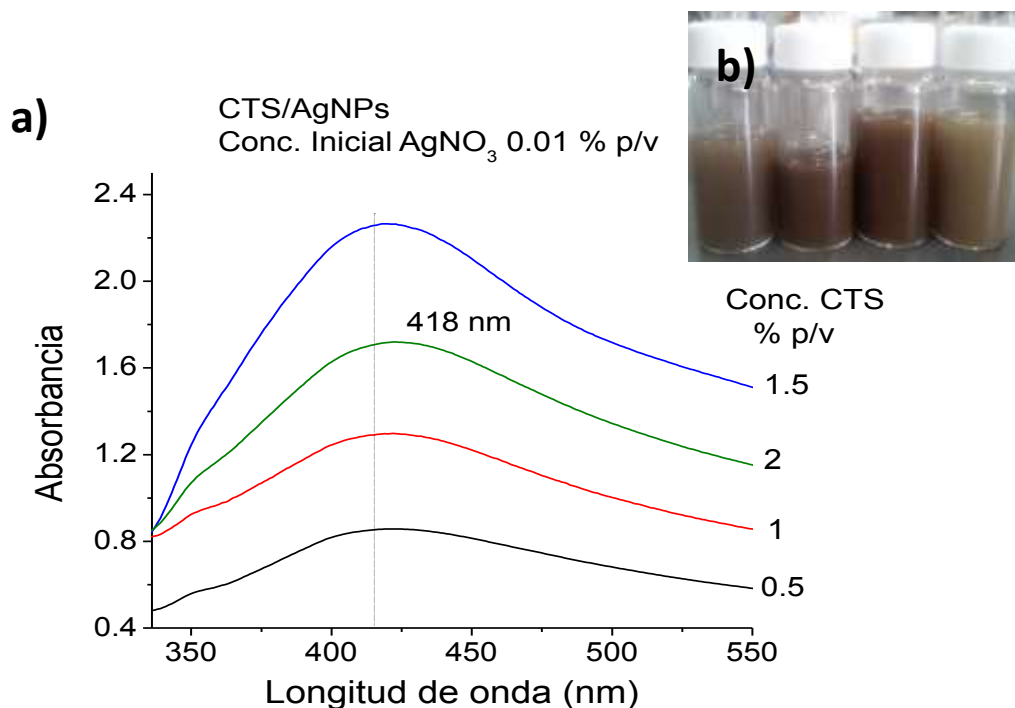


Figura 7. a) Espectro de UV-Vis de los compósitos CTS/AgNPs; b) Compósitos CTS/AgNPs diferente concentración de CTS: 0.5, 1, 1.5 y 2 % p/v izquierda a derecha.

La concentración del polímero que asume la función de agente reductor único en la síntesis de NPMs mediante el proceso de fotorreducción es el factor más importante a considerar debido a que el tamaño y morfología de las NPMs depende directamente de la eficiencia del agente reductor, en este caso el polímero en cuestión. Como se puede apreciar en las imágenes de TEM, de la Tabla 1, la concentración del polímero (PVA o CTS) repercute directamente en el proceso de síntesis y consecuentemente en las características físicas de las nanopartículas obtenidas. Evidentemente concentraciones menores a 1.5 % p/v de CTS no resultan eficientes para la formación homogénea de NPMs, mientras que concentraciones mayores a 8 % p/v de PVA dificultan el proceso de síntesis dando como resultado polimorfismo y una mayor distribución en el tamaño de partícula en los compósitos, lo cual compromete la homogeneidad y repercute en las posibles aplicaciones.

4.2 Influencia de la Concentración del Precursor Metálico en la Formación de NPMs

El estudio de la influencia que ejerce la concentración del precursor metálico se evaluó en soluciones acuosas de PVA al 8 % p/v y soluciones en ácido acético de CTS al 1.5 % p/v con concentraciones variables de la correspondiente sal metálica y bajo las mismas condiciones del proceso fotoinducido.

Después de 15 minutos de exposición a la radiación solar, las soluciones polímero-sales metálicas presentaron variaciones de tonalidad: de amarillo a púrpura en el caso de las soluciones con la sal de oro, y de incoloras a café en el caso de las soluciones con la sal de plata; incrementando su intensidad después de 20 minutos. Estas coloraciones denotan la generación de NPMs, resultado de sus propiedades ópticas debido a la resonancia de sus plasmones superficiales (RPS), los cuales proporcionan información referente a la excitación colectiva de los electrones superficiales en los átomos metálicos. Este fenómeno ocurre al interactuar las NPMs con la luz incidente. El incremento de la tonalidad está ligada directamente al incremento de la concentración inicial del precursor metálico, es decir, cuanto mayor es la concentración de la sal metálica, más oscura es la solución resultante como consecuencia de una mayor concentración de metal reducido a nanopartículas (Figura 8).

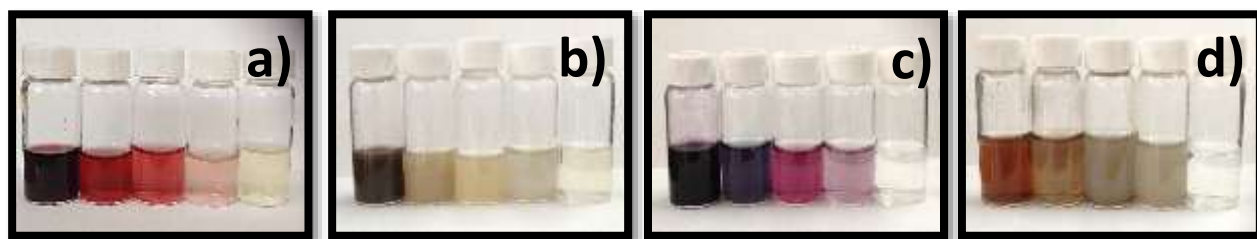


Figura 8. Compósitos en solución después de 30 min de exposición a la radiación solar ordenados de mayor a menor concentración (izquierda a derecha): a) CTS/AuNPs, b) CTS/AgNPs, c) PVA/AuNPs and d) PVA/AgNPs.

Parte importante de la caracterización espectroscópica es el análisis de las muestras mediante UV-Vis ya que las oscilaciones colectivas de los electrones superficiales originan bandas específicas entre 400-450 nm y 500-550 nm características de la presencia de AgNPs y AuNPs respectivamente, constituyendo una herramienta económica, sencilla y rápida para la determinación cualitativa de la presencia de NPMs en el compósito en solución.

Los espectros UV-Vis de las Figuras 9 y 10 muestran el efecto de la variación de la concentración inicial de la sal de plata en la generación de AgNPs. Manteniendo la concentración de CTS y PVA constantes (CTS 1.5 % p/v y PVA 8 % p/v), se observa un incremento en la intensidad al incrementar la concentración inicial de la sal, lo que indica una mayor concentración de AgNPs. Las propiedades ópticas que caracterizan a las NPMs son altamente susceptibles a la morfología y dimensión, como resultado el incremento en el tamaño de partícula o la modificación de su morfología pueden detectarse a través de desplazamientos en la localización de la banda λ_{max} (M^0)/nm. De tal forma que desplazamientos a longitudes de onda mayores o batocrómicos denotan la presencia de nanopartículas de mayor tamaño. Es así que en ambos casos (Figuras 9 y 10), al aumentar la concentración inicial de la sal de plata se presentan desplazamientos

hipsocrómicos, indicando la presencia de nanopartículas de menor dimensión. La aseveración anterior se confirma con el análisis mediante TEM de los compósitos (Figura 11) en donde además se destaca la morfología esférica de las nanopartículas obtenidas en solución.

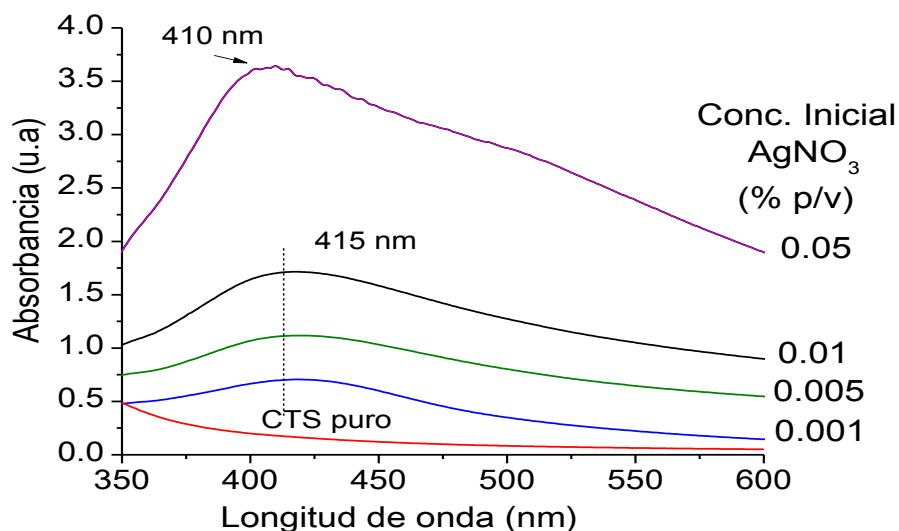


Figura 9. Espectro UV-Vis de los compósitos CTS 1.5 % p/v/AgNPs a distintas concentraciones iniciales del precursor metálico.

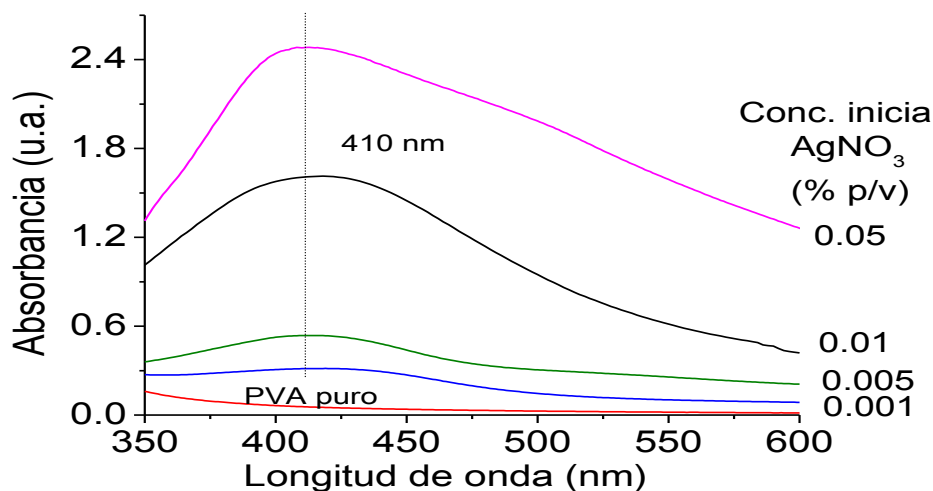


Figura 10. Espectro UV-Vis de los compósitos PVA 8 % p/v/AgNPs a distintas concentraciones iniciales del precursor metálico.

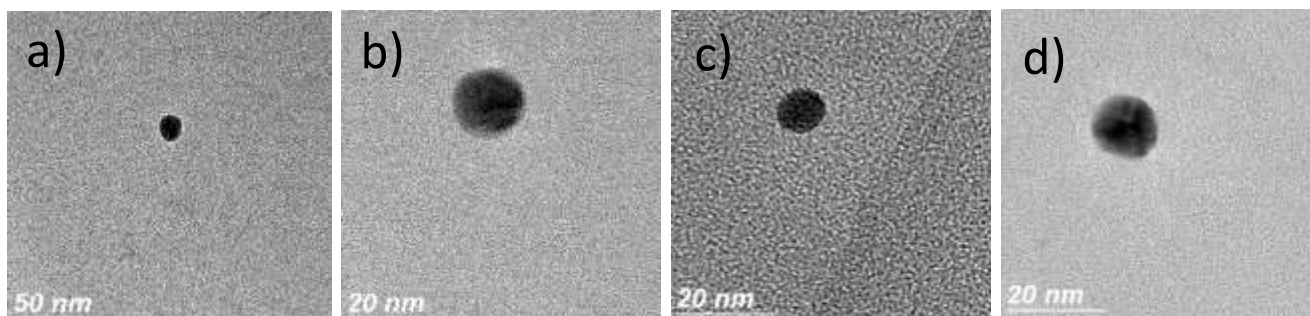


Figura 11. Compósitos CTS 1.5 % p/v: a) AgNPs 0.001 % p/v (16 nm), b) AgNPs 0.01 % p/v (20 nm); compósitos PVA 8 % p/v: c) AgNPs 0.001 %p/v (12 nm), d) AgNPs 0.01 % p/v (8 nm).

En los compósitos CTS/AuNPs y PVA/AuNPs la banda característica de RPS se observa a λ_{\max} 520 y 530 nm, respectivamente (Figuras 12 y 13), indicando la formación de AuNPs en las soluciones. En ambas soluciones poliméricas la posición de la banda correspondiente al plasmón superficial no presenta desplazamientos en la longitud de onda al incrementar la concentración inicial de la sal de oro. La absorbancia del plasmón superficial, sin embargo, sí presenta desplazamientos hipercrómicos, como resultado del aumento en la concentración de AuNPs generadas al incrementar la concentración inicial del precursor metálico.

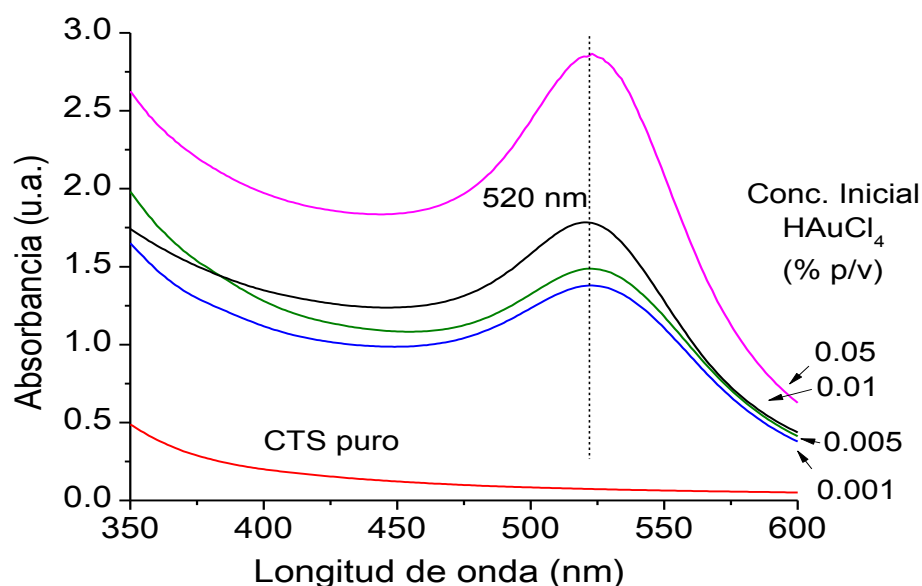


Figura 12. Espectro UV-Vis de los compósitos CTS 1.5 % p/v/AuNPs a distintas concentraciones del precursor metálico.

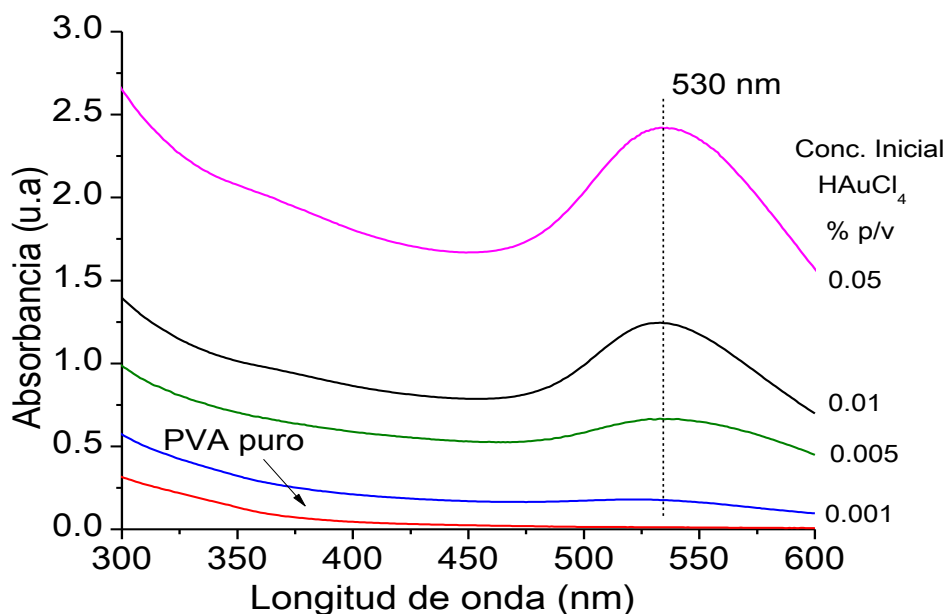


Figura 13. Espectro UV-Vis de los compósitos PVA 8 % p/v/AuNPs a distintas concentraciones del precursor metálico.

La forma y el ancho de las bandas correspondientes al RPS se mantienen sin presentar modificaciones importantes al aumentar la concentración del metal disponible, lo que indica una distribución de tamaño de partícula y morfología similares. La similitud en morfología y dimensiones se pueden apreciar en la Figura 14, donde se muestran las imágenes de TEM de los NPMs de compósitos obtenidos mediante el método de fotoinducción destacando su morfología esférica y la cercanía de sus diámetros promedio.

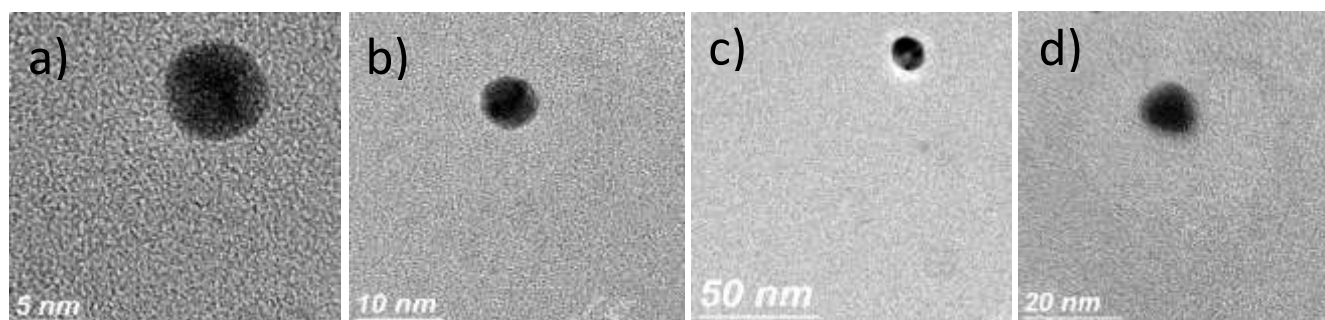


Figura 14. Compósitos CTS 1.5 % p/v: a) AuNPs 0.05 % p/v (7 nm), b) AuNPs 0.005 % p/v (6 nm); compósitos PVA 8 % p/v: c) AuNPs 0.05 % p/v (12 nm), d) AuNPs 0.005 % p/v (10 nm).

La aparición e incremento de la banda correspondiente al plasmón superficial es útil para el seguimiento mediante UV-Vis del proceso de reducción, permitiendo establecer el tiempo óptimo de exposición a la radiación solar directa, así como el monitoreo de la forma, tamaño y agregación de las nanopartículas. Las gráficas de la cinética de la reacción se obtuvieron del monitoreo de las absorbancias en intervalos de 5 minutos de exposición. Las curvas del progreso resultantes se muestran en las Figuras 15 y 16.

Las curvas de progreso presentan comportamiento sigmoideo con periodos de inducción, aumento en la absorbancia y finalmente saturación. Así mismo, la tendencia de las curvas de progreso puede relacionarse con las cuatro etapas de formación de las NPMs: reducción, nucleación, agregación y estabilización.

El proceso de reducción tiene lugar durante los primeros 15 minutos (comportamiento lineal en el gráfico) de la exposición a la radiación solar, y al mismo tiempo se observa el cambio de coloración; en este punto del proceso tiene lugar la reacción de óxido-reducción en donde los iones metálicos M^+ son reducidos a núcleos metálicos cerivalentes (M^0). La segunda etapa implica la nucleación y agregación de los núcleos metálicos (M^0) seguido por la coalescencia, que tiene lugar entre los 15 y 25 minutos, finalmente ocurre la estabilización de las NPMs en la solución polimérica ya que después de 30 minutos de exposición a la radiación solar directa no se observan modificaciones en la coloración y el máximo de la absorbancia mantiene su valor. Es destacable la eficiencia de los polímeros, CTS y PVA, como estabilizantes que mantienen las propiedades ópticas y estructurales iniciales por largos periodos ya que el valor del máximo de la absorbancia obtenido a los 30 minutos se mantiene aún después de 1 mes.

La mayor eficacia del CTS frente al PVA en la reducción cuando se emplea la misma concentración inicial del precursor metálico se evidencia al término del proceso de fotorreducción (véanse Figuras 15 y 16) al presentar mayores valores de absorbancia, lo que se traduce en una mayor concentración de iones metálicos reducidos a nanopartículas lográndose la reducción con una menor concentración de polímero (CTS 1.5 % p/v). Este hecho es posible en gran medida debido a la estructura química del quitosano, que posee grupos $-NH_2$ y $-OH$ ramificados en la cadena central, siendo el grupo amino el grupo funcional que favorece la interacción de los cationes Ag^+ y Au^{3+} , donde posteriormente tiene lugar el proceso de reducción, siendo el grupo $-OH$ el responsable de la reducción de los metales^{3, 56, 58}. A su vez, el PVA presenta solo grupos $-OH$ adyacentes a su cadena central, los cuales son responsables de la estabilización de los cationes metálicos y la posterior reducción. Es por ello que para la eficiencia de una solución polimérica como agente reductor es importante la presencia de grupos electrodonadores que favorezcan el proceso de reducción de sales metálicas por la presencia de pares electrónicos libres en el polímero.

La preparación *in situ* de compósitos polímero/NPMs es una estrategia eficiente que permite la obtención de dichos nanomateriales en solución, minimizando el número de reactivos requeridos y subproductos generados durante el proceso, constituyendo una versión más eco-amigable y postulándole como un método de síntesis verde o sustentable.

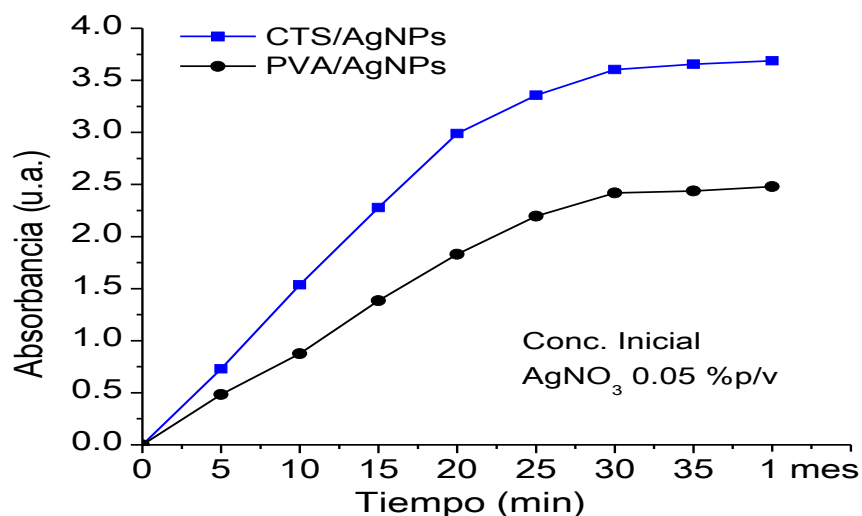


Figura 15. Curvas de progreso de la reducción de AgNO_3 a AgNPs en soluciones de CTS 1.5 % p/v y PVA 8 % p/v.

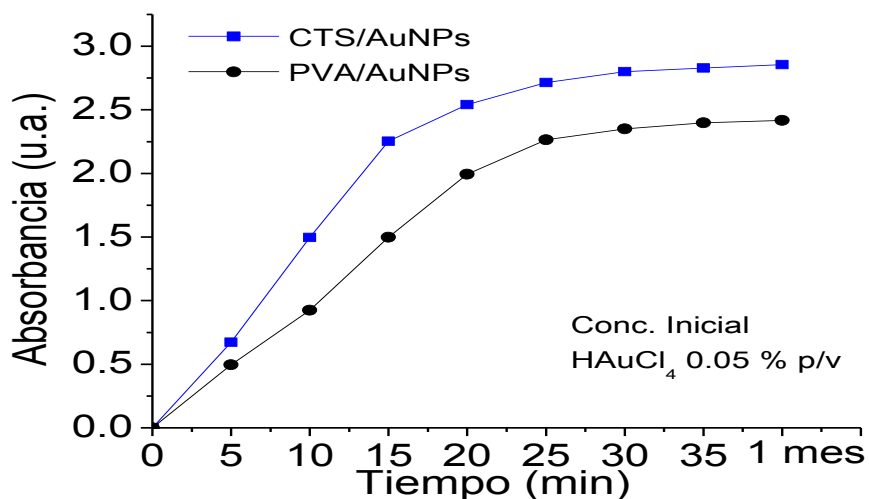


Figura 16. Curvas de progreso de la reducción de HAuCl_4 a AuNPs en soluciones de CTS 1.5 % p/v y PVA 8 % p/v.

4.3 Influencia de la Fuente Energética

Se han empleado diversas fuentes energéticas para inducir la reducción *in situ* de nanopartículas metálicas, donde los grupos electro-donadores tanto del CTS como del PVA ejercen el potencial efecto reductor, mientras que el propio polímero experimenta procesos de oxidación. Con la finalidad de conocer la eficiencia de la reducción fotoinducida mediante radiación solar respecto de otras fuentes energéticas comúnmente empleadas, se realizó el proceso de síntesis bajo las mismas condiciones, en términos de los reactivos empleados y su concentración, evaluando la eficiencia de tres fuentes energéticas: radiación solar directa, radiación UV (Mineralight® UV lamp UVGL-25, MULTIBAND UV-254/366) y tratamiento térmico mecánico (Thermo Scientific SP131325, a 90°C con agitación a 6 rpm).

En las Figuras 17 y 18 se muestran los espectros comparativos de las preparaciones CTS/AuNPs y PVA/AuNPs obtenidas de la reducción de HAuCl_4 0.05 % p/v con distinta fuente energética. Los tiempos requeridos de exposición de los espectros variaron de acuerdo a la fuente energética empleada, es decir, la reducción con radiación solar directa tiene lugar al término de 30 min, mientras que el tratamiento termo-mecánico requiere de 3 horas, y la exposición a la lámpara UV requiere de al menos 16 horas para llegar al máximo de absorbancia alcanzado y sin registrar un cambio adicional en el valor de dicho máximo. Esto indica que no es posible alcanzar valores mayores de absorbancia a los registrados en estos tiempos de exposición en estas condiciones de reacción.

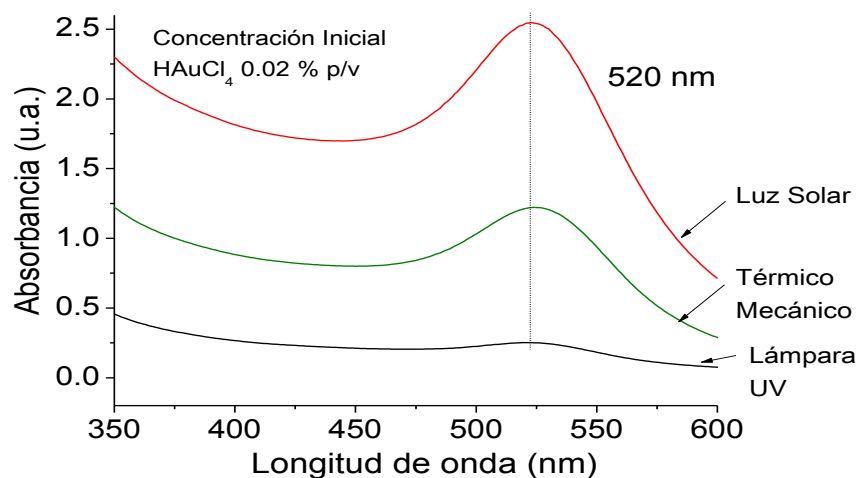


Figura 17. Espectro UV-Vis de los compósitos CTS 1.5 % p/v/AuNPs 0.05 % p/v distinta fuente energética.

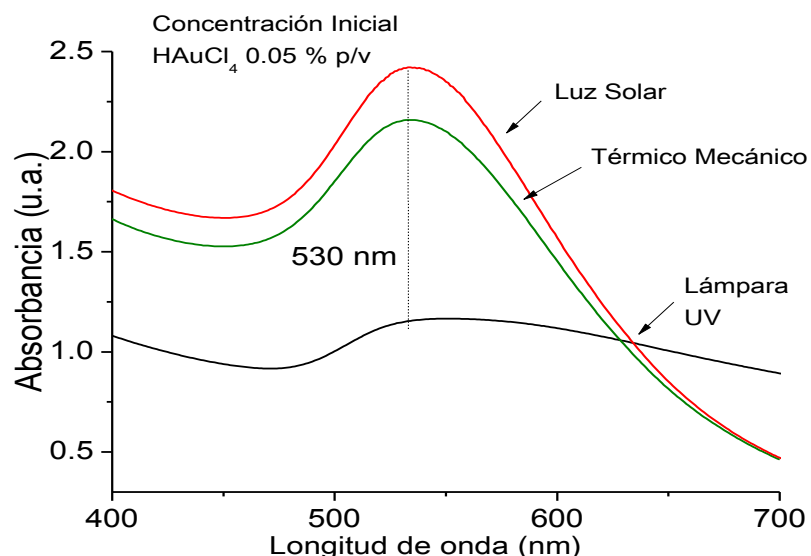


Figura 18. Espectro UV-Vis de los compósitos PVA 8 % p/v/AuNPs 0.05 % p/v distinta fuente energética.

Derivado del análisis de las gráficas y considerando lo anterior, se evidencia que la exposición a la radiación solar es la alternativa más eficiente para la reducción de los precursores metálicos bajo las condiciones de síntesis empleadas, al presentar una mayor concentración de metal reducido a nanopartículas y un mayor grado de monodispersión. Las bandas de absorción características se localizaron a λ_{\max} de 520 nm para las preparaciones en CTS y a 530 nm para las preparaciones en PVA.

En las Figuras 19 y 20 se muestran los espectros comparativos de las preparaciones CTS/AgNPs y PVA/AgNPs obtenidas de la reducción de AgNO_3 a una concentración inicial de 0.05 % p/v con distinta fuente energética. De la misma forma que las preparaciones polímero/AuNPs, los tiempos de exposición de los espectros variaron de acuerdo a la fuente energética: la reducción con exposición directa a radiación solar tiene lugar en un lapso de 30 minutos, la reducción mediante tratamiento termo-mecánico tiene lugar en 3 h, mientras que con lámpara UV requiere al menos 16 horas de exposición.

La banda del plasmón superficial se localizó a λ_{\max} 410 nm (CTS 1.5 % p/v) y 411 nm (PVA 8 % p/v), exhibiendo un mayor grado de monodispersidad en aquellos coloides generados mediante la fotoinducción con la fuente de radiación natural. Los espectros de las fuentes energéticas artificiales sugieren una mayor distribución en el tamaño de partícula al aparecer como bandas más anchas, lo cual es congruente con la evidencia obtenida mediante TEM mostrada en la Figura 21. El método de reducción con radiación solar destaca como una alternativa adecuada para la obtención de nanopartículas de morfología uniforme.

Por otra parte, las preparaciones de CTS 1.5 % p/v expuestas a radiación solar en contraste con aquellas realizadas en PVA 8 % p/v presentan mayor capacidad de reducción al registrar una mayor absorbancia. Esto se traduce en una mayor concentración de AgNPs y AuNPs presentes en las soluciones de los compósitos, lo cual es congruente con lo discutido en las secciones anteriores.

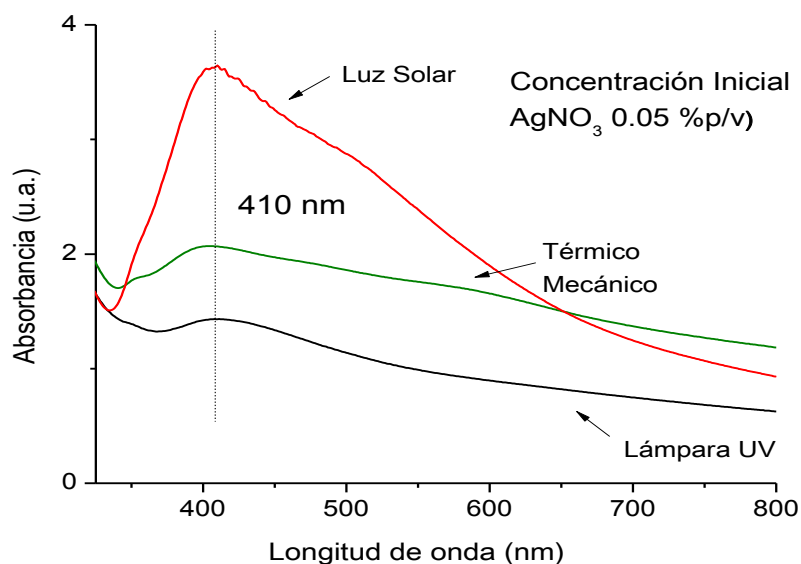


Figura 19. Espectro UV-Vis de los compósitos CTS 1.5 % p/v/AgNPs 0.05 % p/v distinta fuente energética.

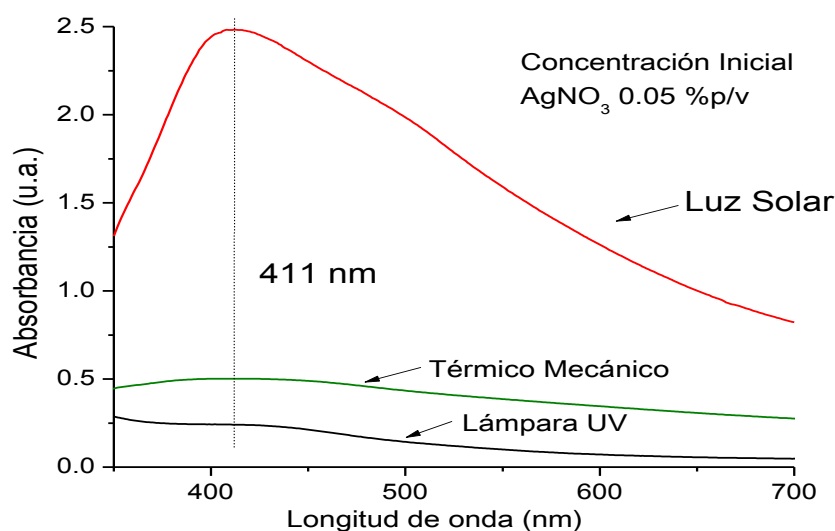


Figura 20. Espectro UV-Vis de los compósitos PVA 8 % p/v/AgNPs 0.05 % p/v distinta fuente energética.

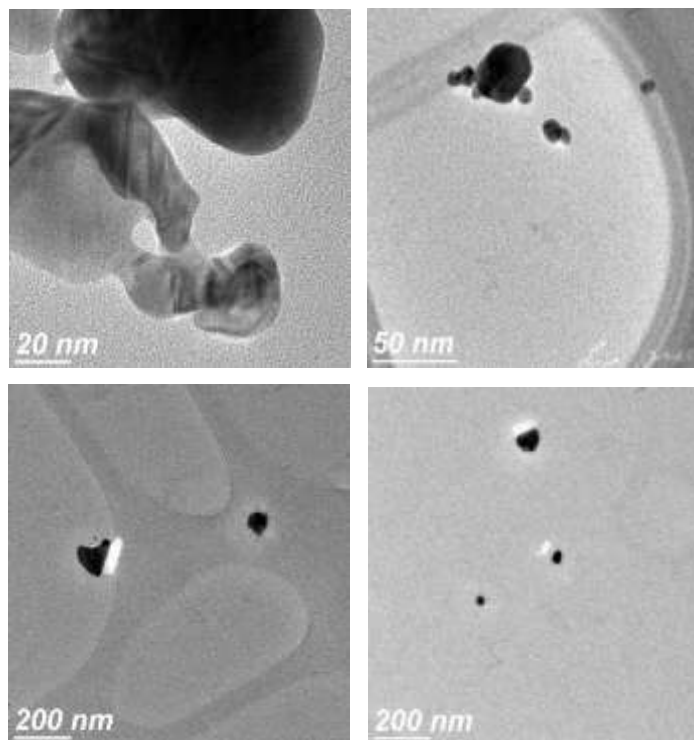
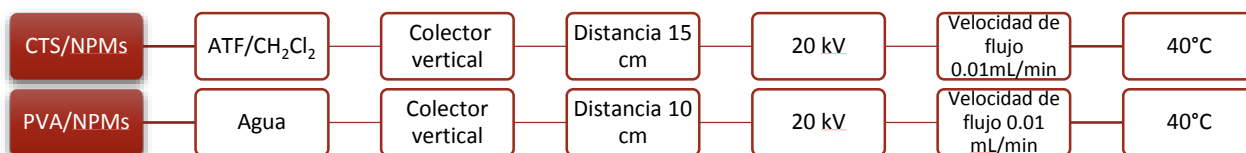


Figura 21. Imágenes de TEM de los compósitos polímero/NPMs obtenidos mediante distinta fuente energética: PVA/AgNPs a) lámpara UV (16 h), b) tratamiento termo-mecánico (3 h); PVA/AuNPs c) lámpara UV (16 h) y d) tratamiento termo-mecánico (3 h).

4.4 Análisis Mediante Microscopia Electrónica de Emisión de Campo FE-SEM

Las condiciones para el procesamiento de las soluciones polímero/NPMs en electrospinning se estandarizaron como se resume en el Esquema 3, estas configuraciones de operación generaron colecciones de nanofibras de alta calidad cuando las concentraciones tanto de PVA como de CTS son del 8 % p/v. Concentraciones menores del polímero no son propicias para el proceso de electrohilado debido a que favorecen la obtención de múltiples defectos a lo largo de las nanofibras, observándose perlas y diámetros variables en las imágenes de FE-SEM de la Figura 22.



Esquema 3. Parámetros de electrospinning para los correspondientes compósitos.

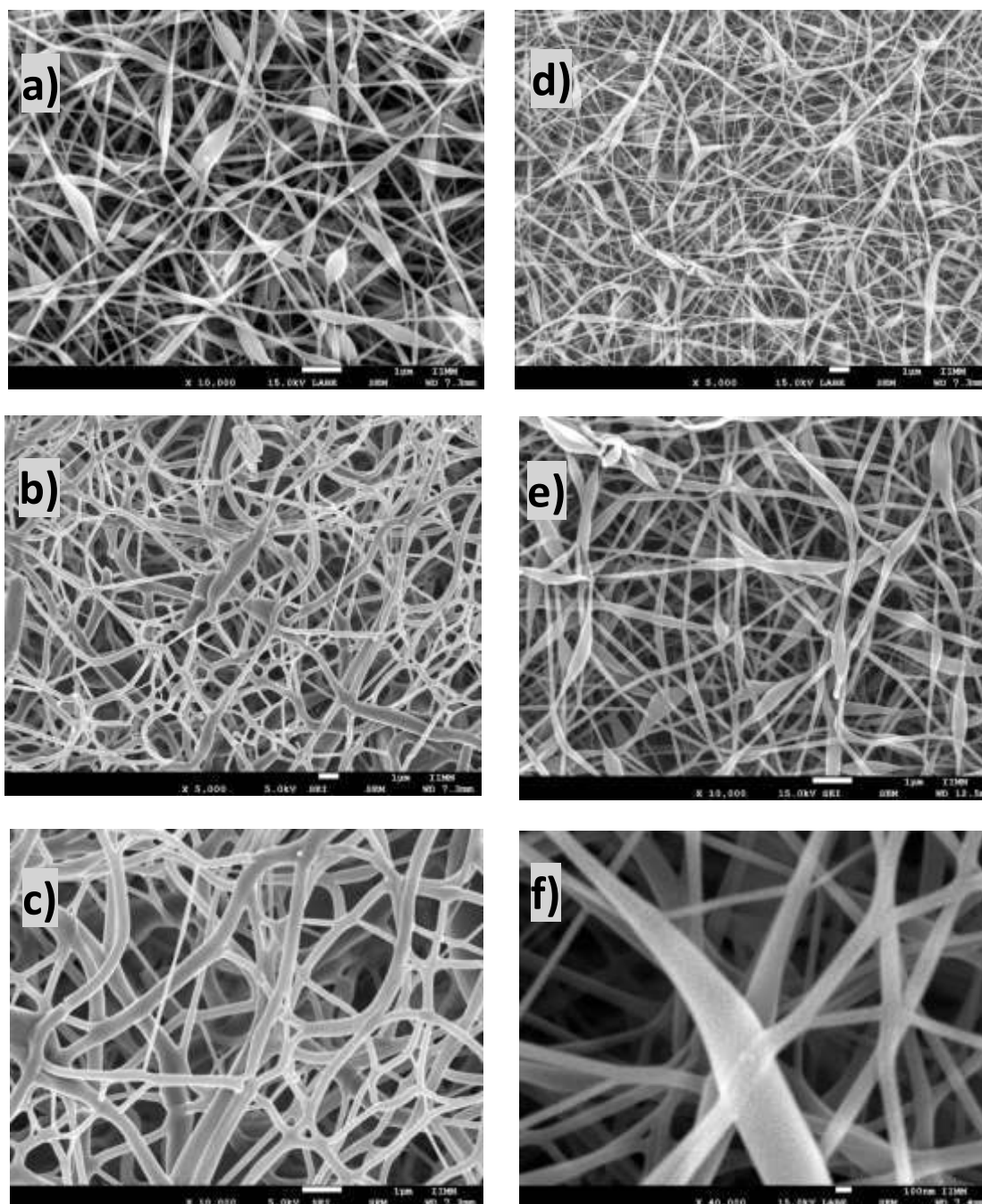


Figura 22. Micrografías FE-SEM de los distintos compósitos: a) CTS 6 % p/v (ATF/CH₂Cl₂)/AgNPs 0.01 % p/v, b) CTS 7 % p/v (ATF/CH₂Cl₂)/AgNPs 0.01 % p/v, c) CTS 8 % p/v (ATF/CH₂Cl₂)/AgNPs 0.01 % p/v, d) PVA 6 % p/v /AuNPs 0.01% p/v, e) PVA 7 % p/v /AuNPs 0.01 % p/v y f) PVA 8 % p/v /AuNPs 0.01 % p/v.

Las imágenes de FE-SEM de los compósitos CTS/AuNPs y CTS/AgNPs en película así como en las colecciones de nanofibras se muestran en la Figura 23. Las películas delgadas obtenidas

mediante evaporación del solvente exhiben distribuciones homogéneas de las nanopartículas en los soportes poliméricos, siendo más notoria la presencia de aglomerados de AuNPs en los compósitos obtenidos en CTS en comparación con los compósitos de AgNPs obtenidas en el mismo polímero. Lo anterior es un claro indicativo de la mejor dispersión y estabilidad que brinda el CTS a las AgNPs formadas (Figura 23a y b). De manera análoga a la obtención de películas delgadas de los compósitos CTS/NPMs se obtuvieron nanofibras mediante la técnica de electrospinning a partir de la disolución de películas en ATF/CH₂Cl₂ 70:30. Las colecciones de nanofibras presentes en la Figura 23c y d carecen de defectos a lo largo de las nanofibras, lo que les confiere alta calidad. La concentración del compósito dispersado en el nuevo sistema de disolventes (CTS/NPMs 8 % p/v) aporta la viscosidad adecuada para el proceso de electrohilado.

El diámetro promedio de las nanofibras individuales de los compósitos CTS/NPMs es de 400 nm aproximadamente y en este caso es posible apreciar la distribución homogénea de las NPMs dentro de las nanofibras así como soportadas a lo largo de las mismas.

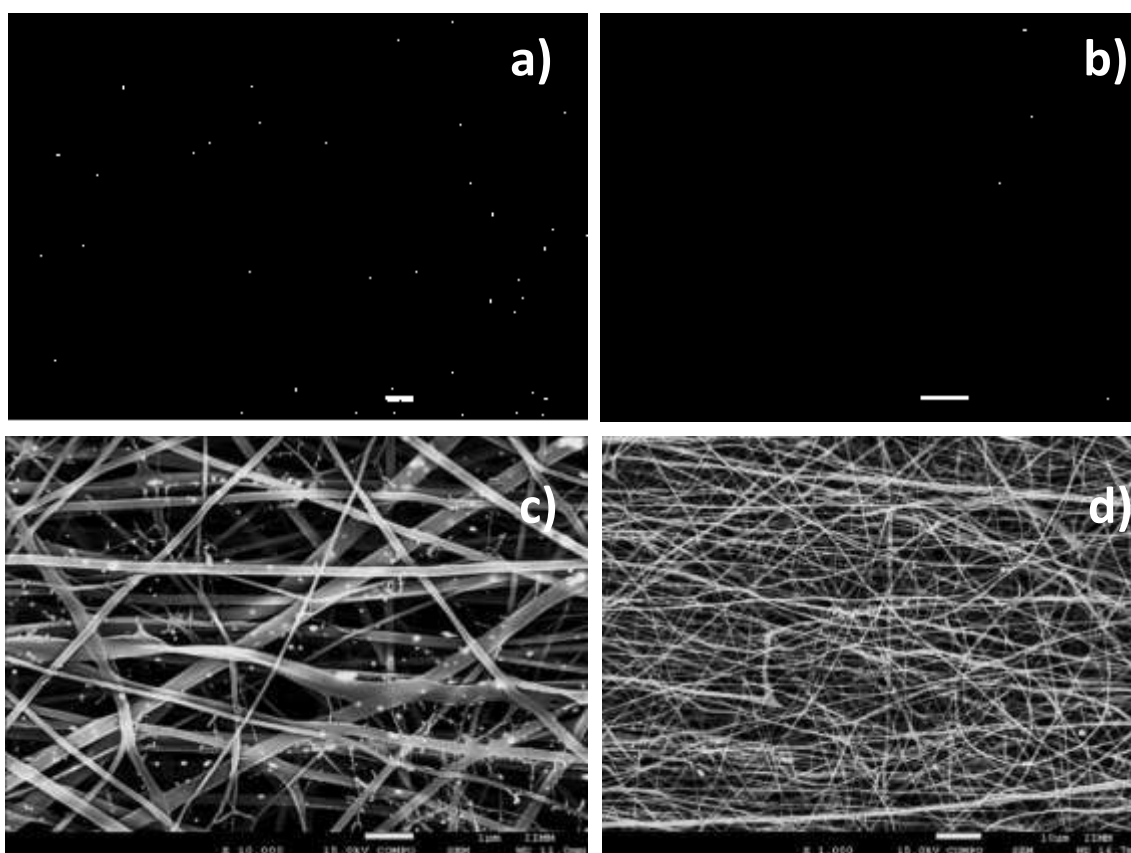


Figura 23. Imágenes de FE-SEM de los compósitos con 0.05 % p/v como concentración inicial de precursor metálico: en película a) CTS 1.5 % p/v/AuNPs y b) CTS 1.5 % p/v /AgNPs; en nanofibras c) CTS 8 % p/v /AuNPs y d) CTS 8 % p/v /AgNPs.

La morfología de los compósitos PVA/NPMs se muestran en la Figura 24. En las películas delgadas (Figuras 24 a y b) se observa una distribución homogénea de las nanopartículas en las matrices poliméricas de PVA, siendo evidente la mejor dispersión y estabilización de las AuNPs ya que el compósito PVA/AgNPs presenta mayor número de aglomerados que en el compósito PVA/AuNPs.

La versatilidad química que presenta el PVA permite el electrohilado de las soluciones PVA/NPMs directamente después de la síntesis en un solo paso del material. La adecuada configuración de los parámetros de electrospinning da origen a colecciones de nanofibras con diámetros individuales de 150 nm aproximadamente sin que se observen defectos a lo largo de las nanofibras.

Las composiciones de nanofibras a base de PVA se muestran en las Figuras 24c y d; la distribución de las NPMs embebidas en las nanofibras se hace presente a modo de zonas luminiscentes sin que se observen nanopartículas soportadas al exterior de las mismas.

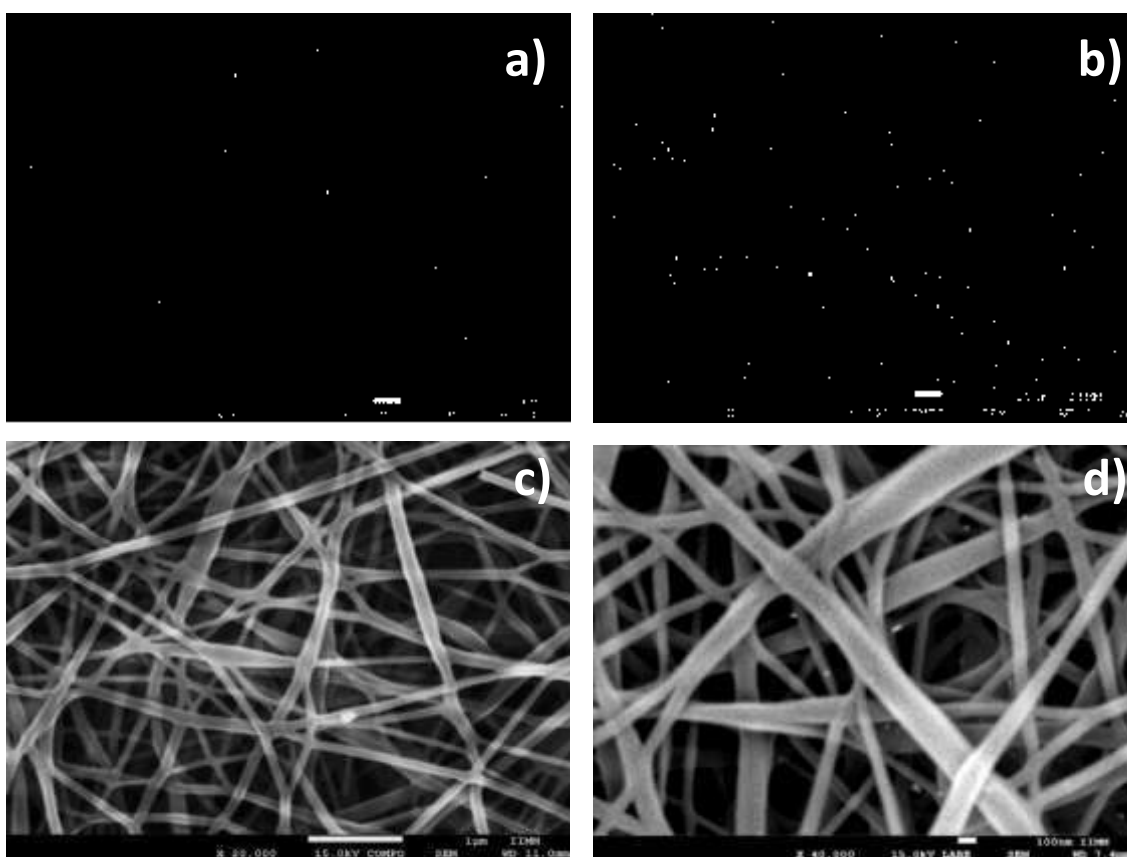


Figura 24. Imágenes de FE-SEM de los compósitos con 0.05 % p/v como concentración inicial de precursor metálico: en película a) PVA 8 % p/v/AuNPs y b) PVA 8 % p/v /AgNPs; en nanofibras c) PVA 8 % p/v /AuNPs y d) PVA 8 % p/v /AgNPs.

4.4.1 Microanálisis por Dispersión de Energía de Rayos X (EDX)

La composición elemental de las colecciones de nanofibras fue analizada de manera cualitativa mediante el microanálisis conocido como EDX o EDS durante la observación de la morfología de los compósitos. En las Figuras 25 a 28 se observan los espectros EDX de las muestras estudiadas durante el microanálisis químico semicuantitativo, donde la radiación X emitida es característica de los elementos presentes en la muestra y cuya intensidad es proporcional a la concentración relativa del elemento detectado.

Los espectros de la Figura 25 y 26 muestran la presencia de C, O, N y F en los compósitos CTS/NPMs así como las componentes correspondientes a los elementos: Ag a 0.3 y 3 keV (Figura 25); y tres señales para Au a 0.2, 2.15 y 9.75 keV (Figura 26).

Los espectros de las nanofibras de compósitos PVA/NPMs presentan señales características de C y O a 0.25 y 0.5 keV, componentes del soporte polimérico, así como señales atribuidas a Ag en 0.3 y 3 keV (Figura 27) y Au en 0.2, 2.15 y 9.75 keV (Figura 28).

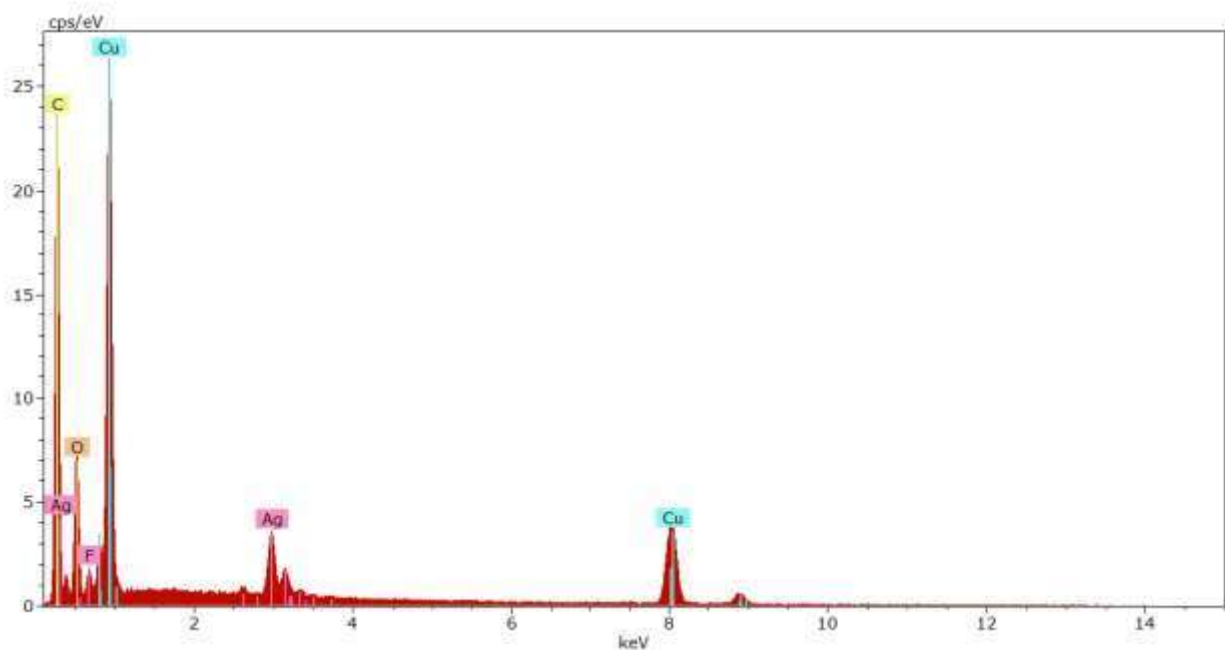


Figura 25. Espectro EDX del compuesto CTS/AgNPs 0.01 % p/v.

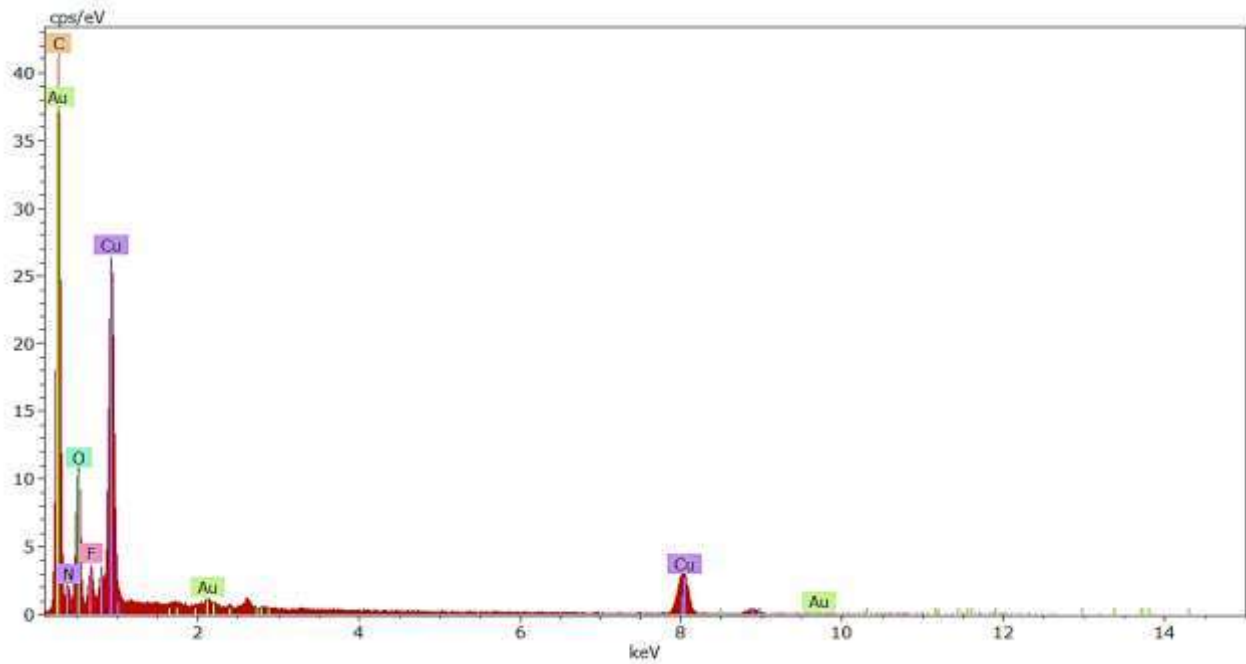


Figura 26. Espectro EDX del compuesto CTS/AuNPs 0.05 % p/v.

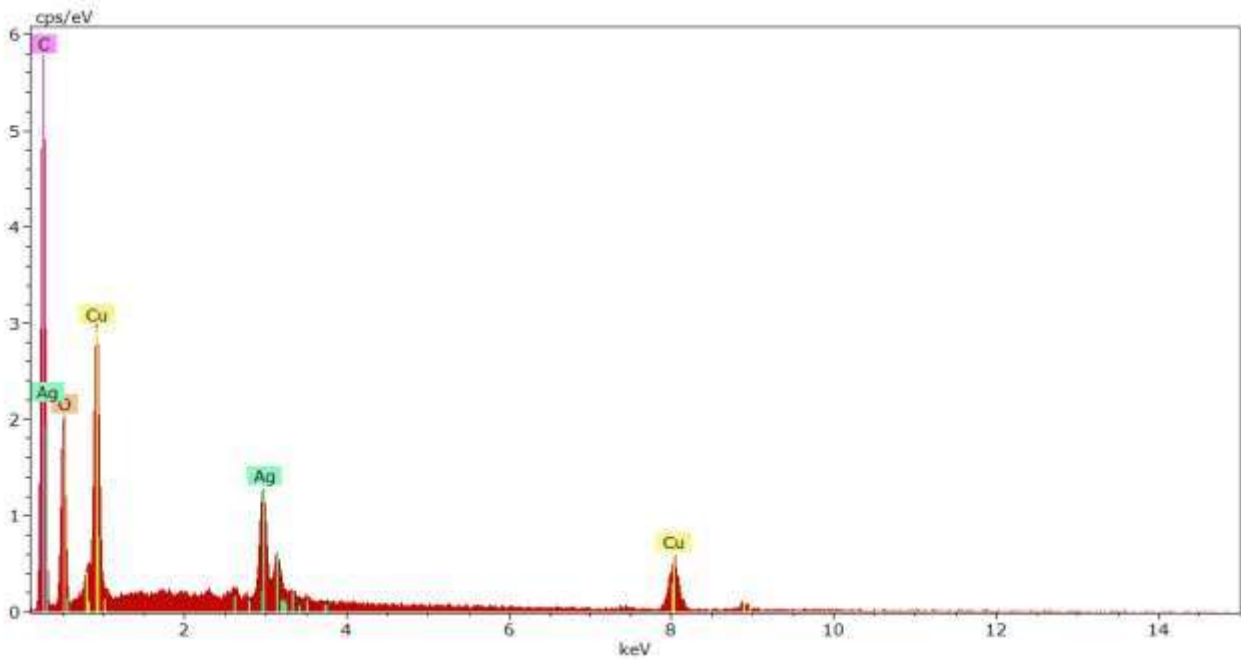


Figura 27. Espectro EDX del compuesto PVA/AgNPs 0.01 % p/v.

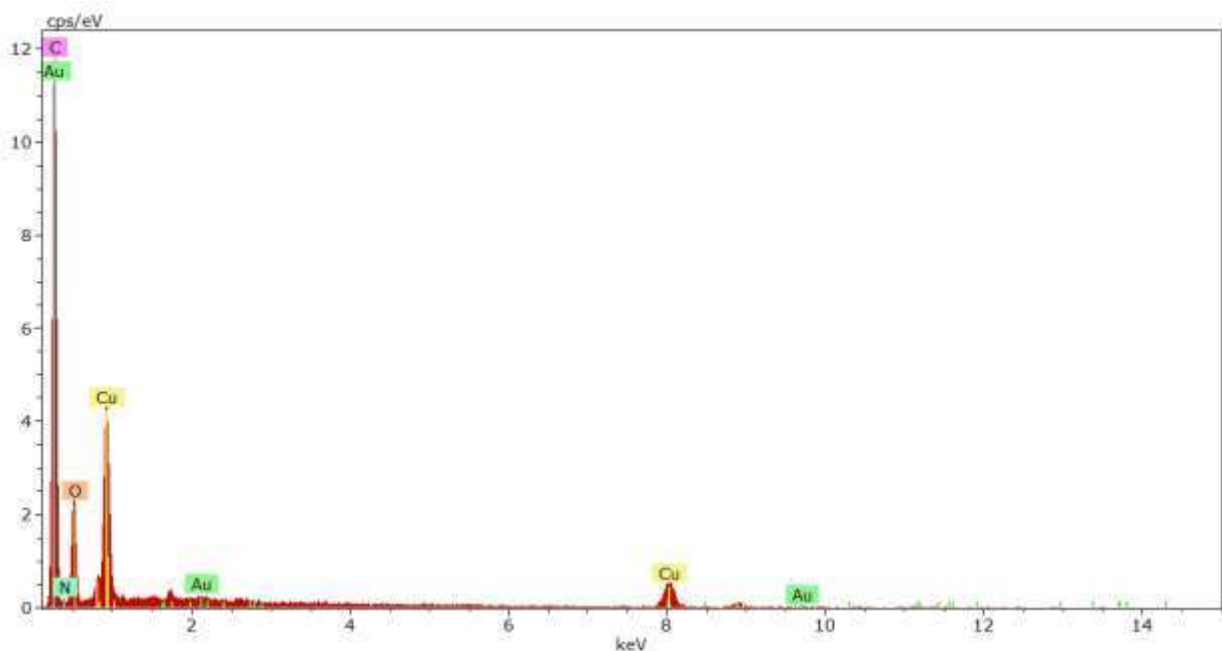


Figura 28. Espectro EDX del compuesto PVA/AuNPs 0.01 % p/v.

El espectro correspondiente a las colecciones de nanofibras CTS/NPMs (Figuras 27 y 28) aún presentan remanentes de flúor procedentes del sistema de disolventes requerido para el proceso de electrospinning, lo que denota la necesidad de realizar un tratamiento a las nanofibras para la eliminación del flúor remanente.

4.5 Análisis de Superficie por Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X

La técnica de XPS es una herramienta espectroscópica para el análisis químico de superficies, la cual permite determinar diferentes estados de oxidación de los elementos que lo componen. En la Figura 29 se presenta el espectro correspondiente al compuesto CTS/AgNPs el cual presenta energías de enlace características de las componentes correspondientes al quitosano: oxígeno 1s, carbono 1s y nitrógeno 1s, el espectro confirma la presencia de AgNPs (Ag^0) con la señal doble alrededor de 370 eV, el análisis en alta resolución de esta región del espectro muestra claramente el par de señales del acoplamiento spin-orbital referidas a las componentes $3d_{5/2}$ (367 eV) y $3d_{3/2}$ (373 eV) vinculadas a la presencia de Ag metálica con apertura de 6.0 eV entre ellas.

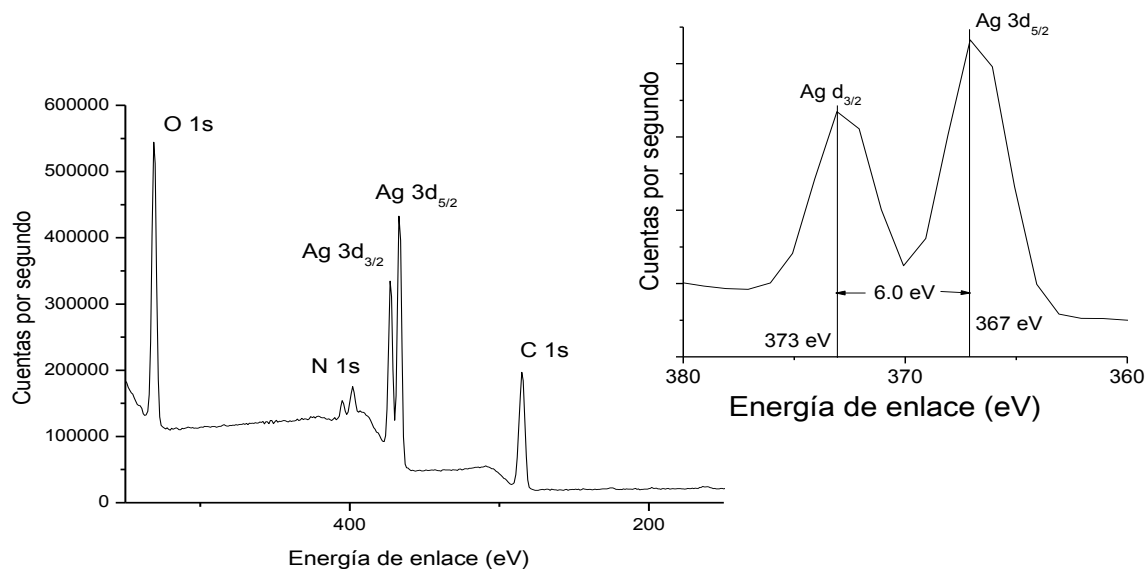


Figura 29. Espectro de XPS del compuesto CTS/AgNPs 3 % p/v.

En el espectro de la Figura 30 se aprecian las componentes de carbono 1s y oxígeno 1s propias al polímero PVA mientras que las señales de plata se observan alrededor de 370 eV. El estudio más detallado de las señales cercanas a 370 eV permite el análisis del doblete de las componentes 3d con una distancia entre ellas de 6.0 eV siendo 3d_{5/2} a 367 eV y 3d_{3/2} a 373 eV concernientes a plata metálica (Ag⁰).^{87, 88}

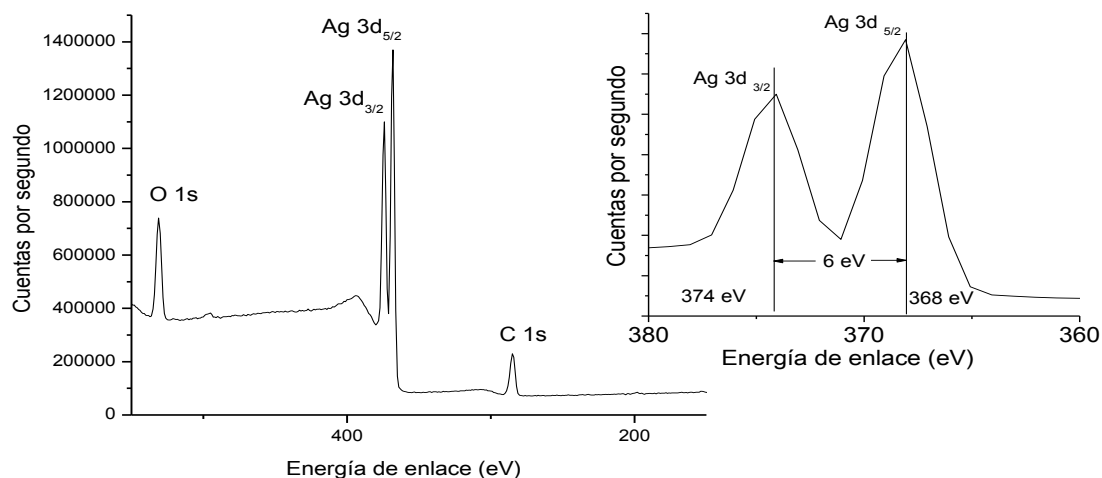


Figura 30. Espectro de XPS del compuesto PVA/AgNPs 2 % p/v.

Los espectros de XPS de los compósitos CTS/AuNPs y PVA/AuNPs se muestran en las Figuras 31 y 32. En el espectro de la Figura 31 se observan las componentes de energías de enlace

características de O 1s, C 1s y N 1s correspondientes del polímero CTS mientras que la señal doble del acoplamiento spin-orbital correspondiente a Au 4f_{5/2} y 4f_{7/2} se observa con una apertura de 3.65 eV entre 94.68 y 91.05 eV respectivamente.

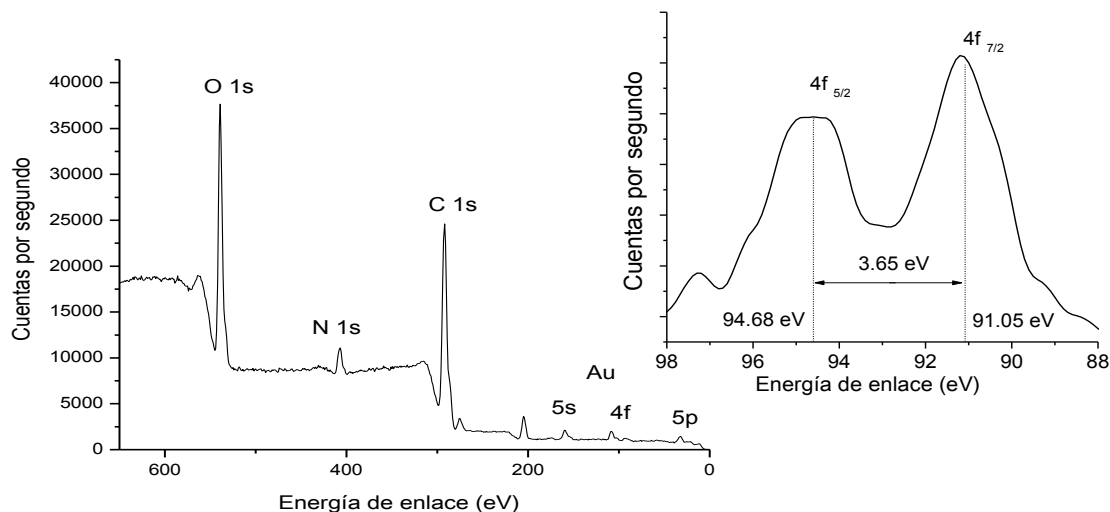


Figura 31. Espectro de XPS del compuesto CTS/AuNPs 3 % p/v.

En el espectro de la Figura 32 se observa de igual manera la señal doble del acoplamiento spin-orbital de las componentes 4f_{5/2} y 4f_{7/2} a 90.58 y 86.93 eV respectivamente, manteniendo una apertura de 3.65 eV guardando las características representativas de oro cerovalente (Au⁰),⁸⁴ además de las componentes para C 1s y O 1s presentes en la estructura del PVA. Es así que este análisis representa una evidencia adicional de la generación de nanopartículas metálicas a partir del procedimiento empleado.

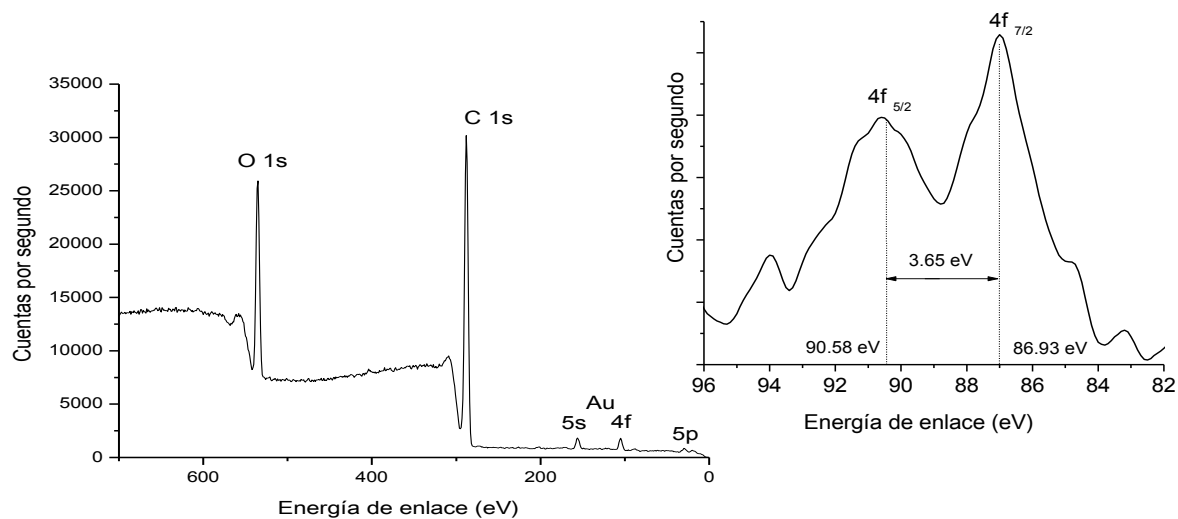


Figura 32. Espectro de XPS del compuesto PVA/AuNPs 2 % p/v.

4.6 Análisis Mediante Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier FT-IR

En los espectros de las Figuras 33 y 34 se presentan los resultados del análisis mediante FT-IR de los compósitos PVA/AgNPs y PVA/AuNPs. Los espectros de PVA puro (8 % p/v) muestran las bandas características de la vibración por estiramiento del grupo funcional –OH en 3305 cm^{-1} , en 2927 cm^{-1} la vibración del estiramiento asimétrico del enlace C-H y simétrico en 2877 cm^{-1} , en 1070 cm^{-1} aparece la señal de estiramiento del enlace C-O y en 848 cm^{-1} la vibración fuera del plano del grupo –OH.

Los espectros de los compósitos PVA/NPMs presentan cambios en la intensidad de las señales correspondientes al grupo –OH (3305 cm^{-1} de la vibración de estiramiento, 1305 cm^{-1} el estiramiento del enlace O-H acoplado en el plano y 1420 cm^{-1} de la flexión de aleteo del enlace C-H) como consecuencia de la interacción de los grupos –OH adyacentes a la cadena polimérica con las nanopartículas de oro y plata, respectivamente.

En la Figura 35 se presenta la comparación de los espectros de los compósitos PVA/NPMs 0.05 % p/v en forma de fibras y películas delgadas, las vibraciones características se mantienen presentando únicamente modificaciones en la intensidad.

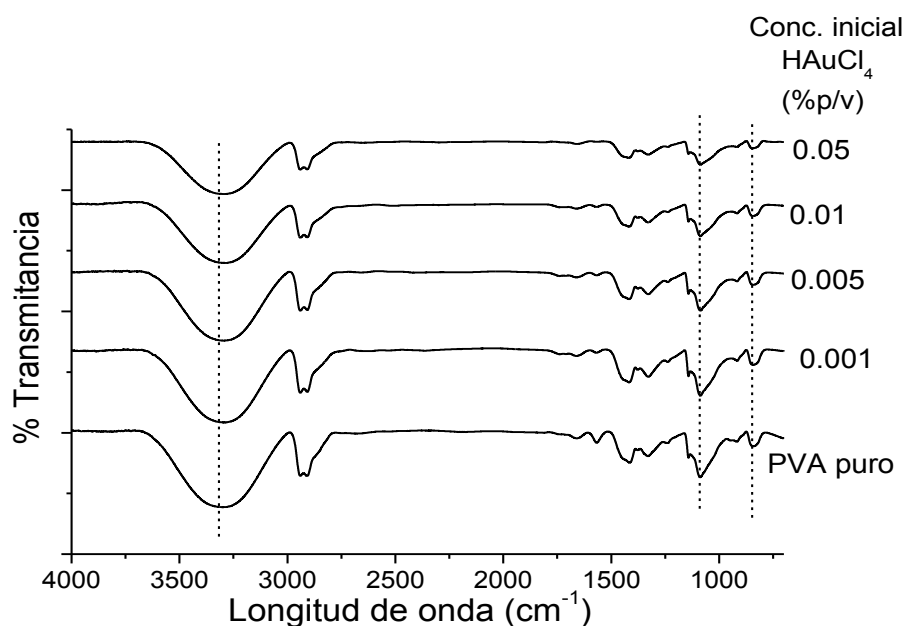


Figura 33. Espectro FT-IR de los compósitos PVA/AuNPs a diferentes concentraciones del precursor metálico inicial.

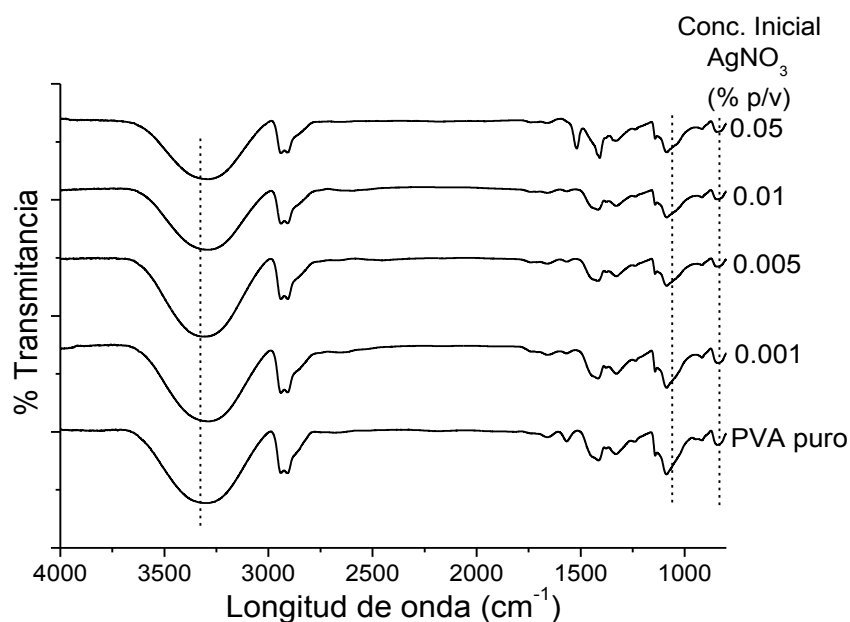


Figura 34. Espectro FT-IR de los compósitos PVA/AgNPs a diferentes concentraciones del precursor metálico inicial.

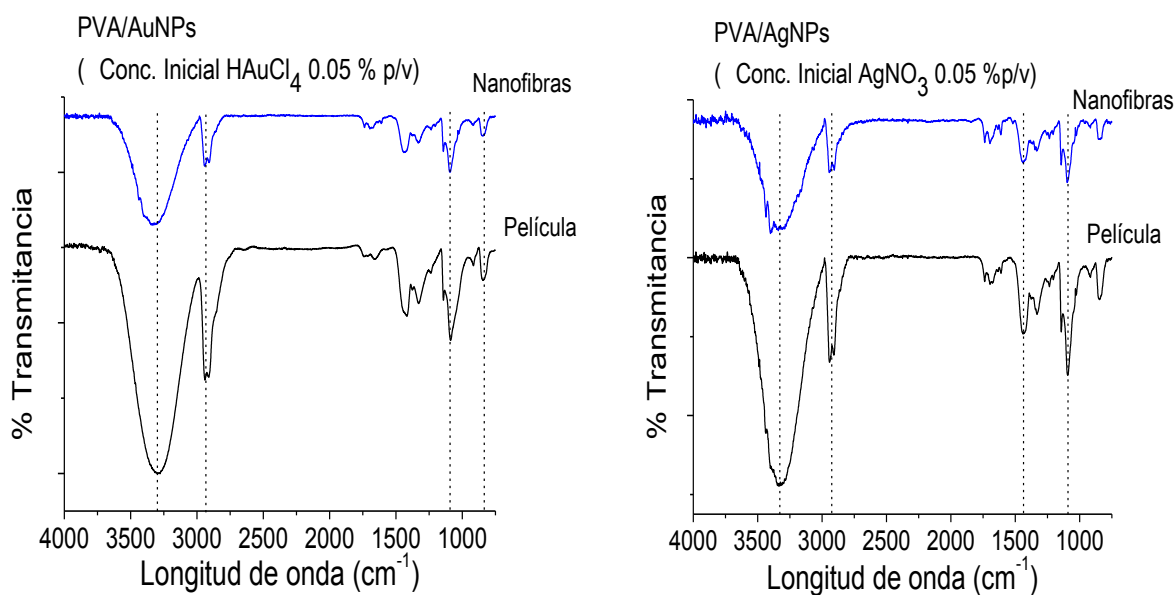


Figura 35. Espectros comparativos de los compósitos PVA/NPMs 0.05 % p/v en fibras y películas.

En la Figura 36 y 37 se presentan los espectros de FT-IR de CTS, CTS/AuNPs y CTS/AgNPs, los espectros de CTS puro generan bandas características en 3376 cm⁻¹ y 3263 cm⁻¹ por el traslape

de las bandas de estiramiento de los enlaces O-H y N-H respectivamente, las bandas en 2869 cm^{-1} y 1365 cm^{-1} corresponden a la vibración del enlace C-H y la deformación simétrica de CH_3 respectivamente, el estiramiento del C=O aparece en 1630 cm^{-1} , en 1450 cm^{-1} aparece la señal de vibración de amida II (NH) por la deformación en el plano acoplada con la vibración de estiramiento de C-N, en 1546 cm^{-1} la flexión del enlace de amida III (estiramiento de C-N acoplado en el plano con N-H) acoplada con el estiramiento por aleteo de CH_2 y la vibración en el plano del enlace O-H, en 1450 cm^{-1} aparece la flexión del enlace C-H y el estiramiento en 1064 cm^{-1} del enlace C-O.

Los espectros de los compósitos presentan modificaciones significativas (respecto al quitosano puro) en la posición e intensidad de las señales de traslape de las vibraciones de los enlaces O-H y N-H (3376 cm^{-1} y 3263 cm^{-1}) y las bandas localizadas en 1546 y 1150 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones de los grupos amida II y las vibraciones de estiramiento de C-N, respectivamente, como resultado de las interacciones de estos grupos funcionales con las NPMs. Es evidente que existe un mayor cambio tanto en intensidad como en desplazamiento al aumentar la concentración inicial de la sal, resultado de una mayor interacción de estos grupos funcionales por la presencia de un mayor número de nanopartículas.

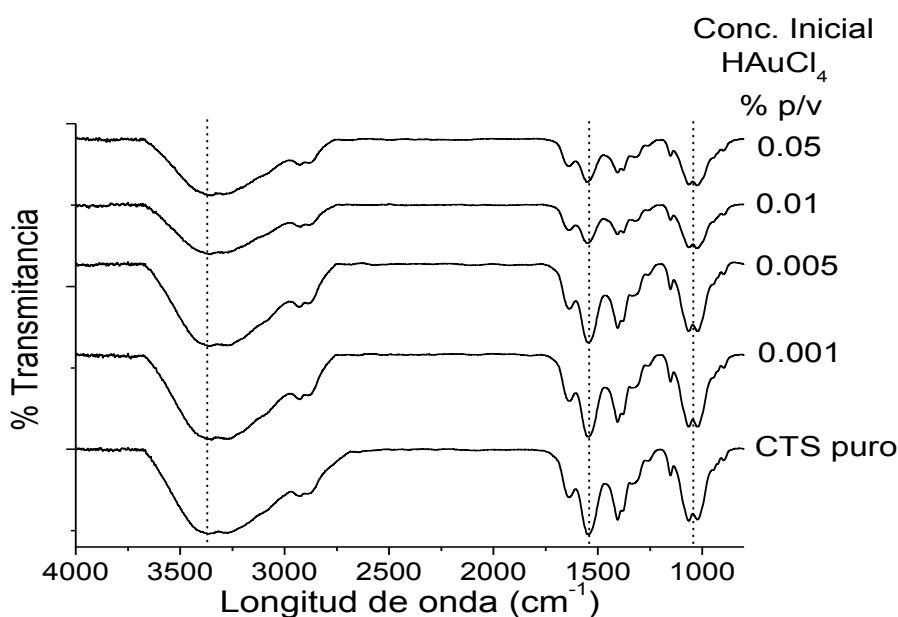


Figura 36. Espectro FT-IR de los compósitos CTS/AuNPs a diferentes concentraciones del precursor metálico inicial.

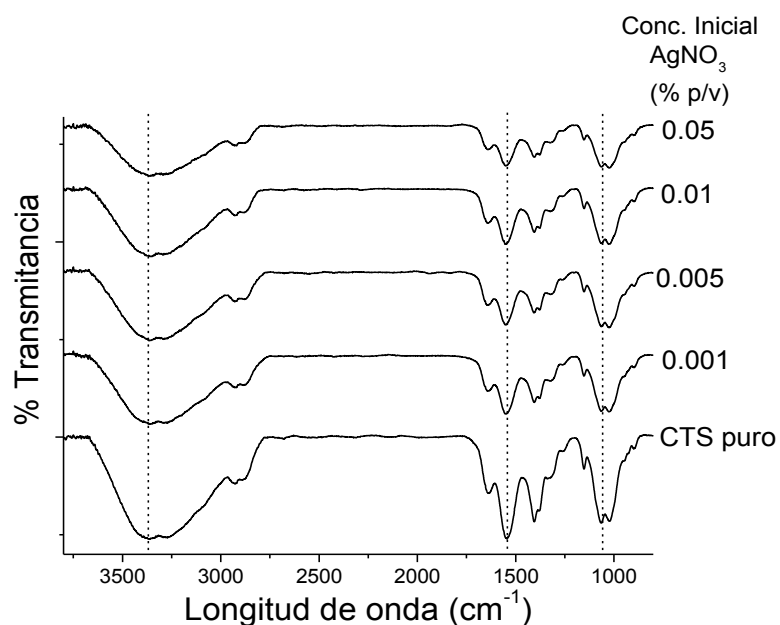


Figura 37. Espectro FT-IR de los compósitos CTS/AgNPs a diferentes concentraciones del precursor metálico inicial.

Los espectros de FT-IR de los compósitos CTS/NPMs en forma de películas y nanofibras presentan marcadas diferencias (Figura 38). El espectro de las nanofibras de quitosano presenta mayor definición en las señales por estiramiento del enlace N-H presente entre 3400 y 3200 cm⁻¹, además de presentar bandas de vibración en modo de tensión del enlace C=O en 1670 cm⁻¹ y el conjunto de señales entre 100 y 1250 cm⁻¹ correspondientes a lo estiramientos simétrico y asimétrico del enlace C-F, como evidencia de la formación del trifluoroacetato de quitosano la cual favorece el proceso de electrospinning y la formación de nanofibras base quitosano, el cual es de difícil procesamiento mediante esta técnica.

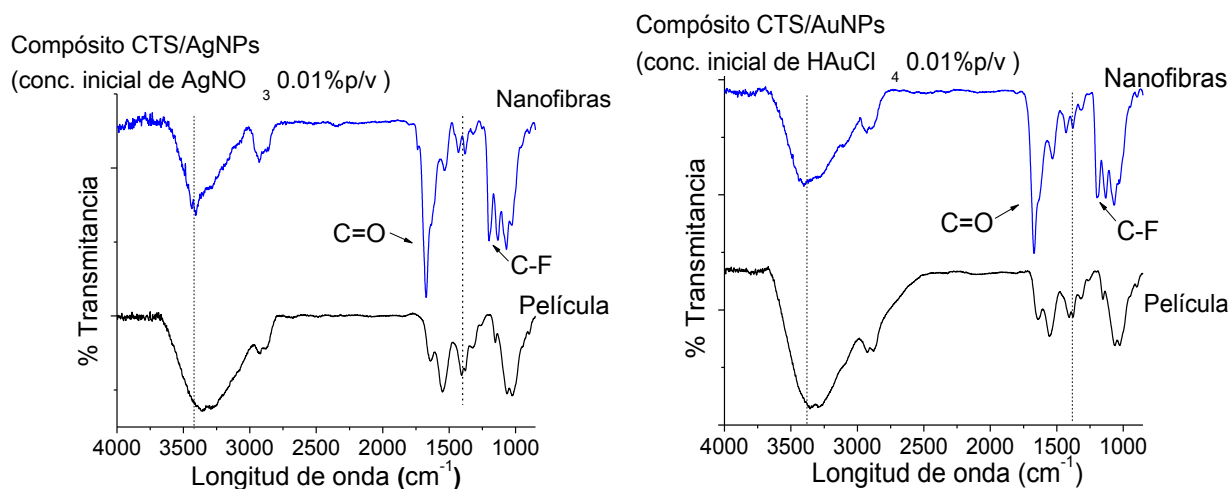


Figura 38. Espectros comparativos de los compósitos PVA/NPMs 0.05 %p/v en fibras y películas.

4.7 Ensayos de solubilidad e hinchamiento

La resistencia a la humedad y la capacidad de absorción son aspectos trascendentales a considerar dentro de la caracterización de un material, así mismo, cuando su aplicación final se orienta al campo de la medicina destaca la importancia del comportamiento en fluidos fisiológicos simulados o bien entornos extracelulares propicios.

Por lo anterior se evaluó el comportamiento de los compósitos tanto en películas como en nanofibras en disolventes comúnmente empleados para el desarrollo de técnicas de biología celular, los resultados de solubilidad se engloban en la Tabla 2.

Tabla 2. Solubilidad de los materiales polímero/NPMs.

BIOPELÍCULAS				
	PVA/AgNPs	PVA/AuNPs	CTS/AgNPS	CTS/AuNPs
McCoy	I	I	I	I
DEMEM	I	I	I	I
Sol. fisiológica	I	I	I	I
Agua destilada	I	I	I	I
NANOFIBRAS				
	PVA/AgNPs	PVA/AuNPs	CTS/AgNPS	CTS/AuNPs
McCoy	P	P	S	S
DEMEM	P	P	S	S
Sol. fisiológica	P	P	S	S
Agua destilada	P	P	S	S

(I) Insolubles (S) Solubles (P) Poco solubles a 37°C

Los compósitos en forma nanofibras presentan solubilidad variable para cada grupo de compósitos, es decir, los compósitos PVA/NPMs son poco solubles a 37°C mientras que los compósitos CTS/NPMs son altamente solubles tanto a temperatura ambiente como a 37°C. A su vez, todos los compósitos, PVA/NPMs y CTS/NPMs en forma de biopelículas resultan insolubles a temperatura ambiente y a 37°C en los disolventes empleados.

Simultáneamente se realizaron perfiles de absorción de humedad para los compósitos polímero/NPMs en biopelículas y nanofibras empleando el medio de cultivo DEMEM, el cual mimetiza de manera adecuada el entorno extracelular y agua destilada que representa el fluido a elección por excelencia para la evaluación de la capacidad de absorción de un material, los resultados se expresan en porcentajes de hinchamiento (% s) en las Figuras 39 y 40, los cuales fueron calculados a partir de la siguiente fórmula:

$$\% s = \frac{(p_f - p_o)}{p_o} \cdot 100$$

Dónde: % s= % de hinchamiento
 p_o = peso inicial p_f = peso final

En la Figura 39 se observan los perfiles de hinchamiento de los compósitos en forma de biopelículas, en ambos conjuntos de gráficas (39a y 39b) es evidente la mayor capacidad de absorción de los materiales a base de CTS en comparación con los compósitos de PVA.

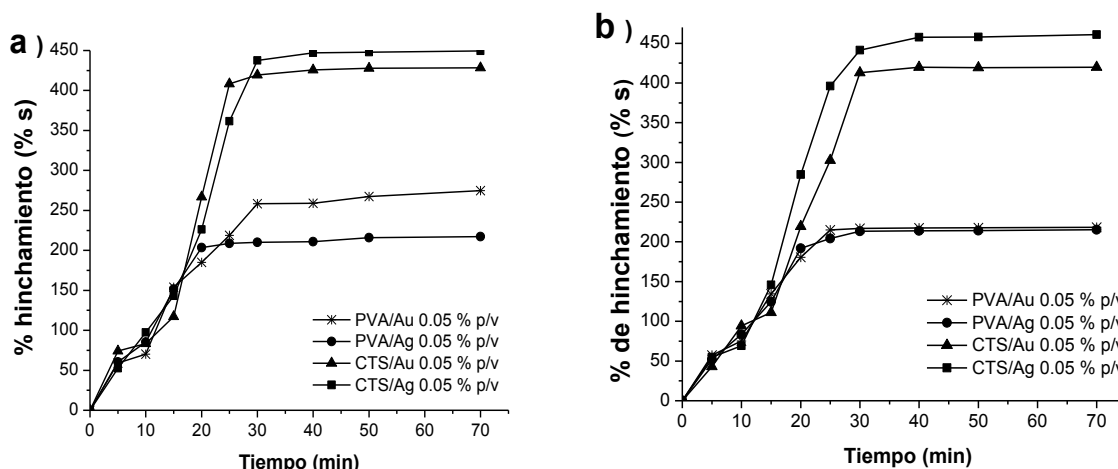


Figura 39. Perfiles de hinchamiento de las biopelículas de los compósitos a) DEMEM y b) agua destilada.

En contraste con el comportamiento evidenciado en la Figura 39, las nanofibras de los compósitos de PVA/NPMs presentan mayor capacidad de absorción frente a las nanofibras de CTS/NPMs, como se aprecia en la Figura 40. Lo anterior es posible debido al sistema de disolventes ATF/CH₂Cl₂ necesario para el electrohilado de los compósitos de CTS, de tal forma que como resultado del proceso de electrospinning, una cantidad de quitosano presente en la colección de nanofibras se encuentra en su correspondiente sal (trifluoroacetato de quitosano), lo cual le hace soluble en agua y fluidos fisiológicos simulados ocasionando la pérdida de peso de la muestra.

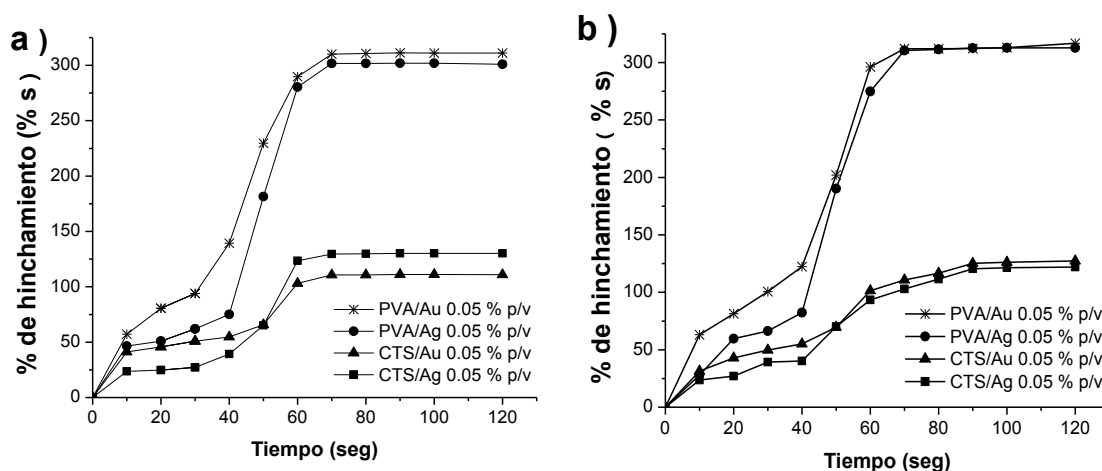


Figura 40. Perfiles de hinchamiento de las nanofibras de los compósitos a) DEMEM y b) agua destilada.

4.8 Análisis *in vitro* en la Línea Celular HT-29

4.8.1 Adhesión

El mayor potencial de los materiales polímero/NPMs es sin duda su aplicación como biomateriales, debido a ello es imprescindible la evaluación de su biocompatibilidad así como la viabilidad o citotoxicidad que generen a sistemas biológicos expuestos a su contacto.

Para la evaluación *in vitro* de los materiales polímero/NPMs se recurrió a la línea celular HT-29, la cual proviene de adenocarcinoma colo-rectal, la cual es una línea celular epitelial que presenta propiedades adherentes y ciclos de proliferación cortos, cualidades que favorecen la realización de ensayos *in vitro*. Las condiciones experimentales se definieron a partir de una prueba preliminar (Apéndice B), realizándose ensayos de adhesión por duplicado en cultivos de 100,000 células iniciales por pozo, incubadas durante 24 h a 37°C y atmósfera de 5% CO₂, la confluencia y morfología de los cultivos se muestra en la Figura 41.

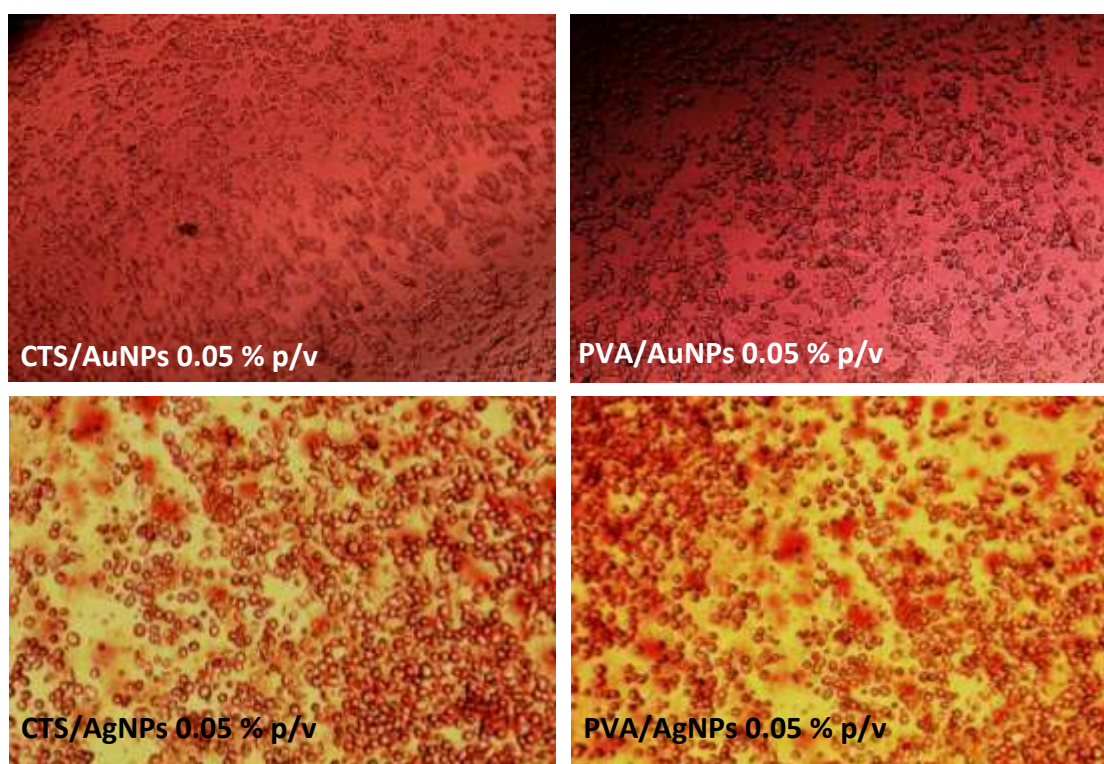


Figura 41. Imágenes de las células HT-29 a 24 h de incubación sobre los materiales compuestos previo a los ensayos colorimétricos, imágenes obtenidas mediante el software Motic Images Plus 2.0.

Los ensayos de adhesión celular sobre los soportes polímero/NPMs se realizaron mediante dos tinciones: azul de toluidina y cristal violeta para su validación. En la Tabla 3 se

presentan los resultados estadísticos obtenidos mediante el análisis de sus densidades ópticas, y de manera gráfica respecto al control positivo se presentan en la Figura 42.

Tabla 3. Resultados estadísticos obtenidos a partir de las densidades ópticas de los cultivos a 24 h de incubación.

Compósito	Azul Toluidina			Cristal Violeta		
	Media	DS	% CV	Media	DS	% CV
PVA/Ag	1.67	0.1	10.38	0.91	0.02	1.7
CTS/Ag	1.35	0.068	50.49	0.92	0.046	50.15
PVA/Au	1.38	0.048	3.5	1.11	0.05	4.35
CTS/Au	2.13	0.056	26.06	1.13	0.12	10.58

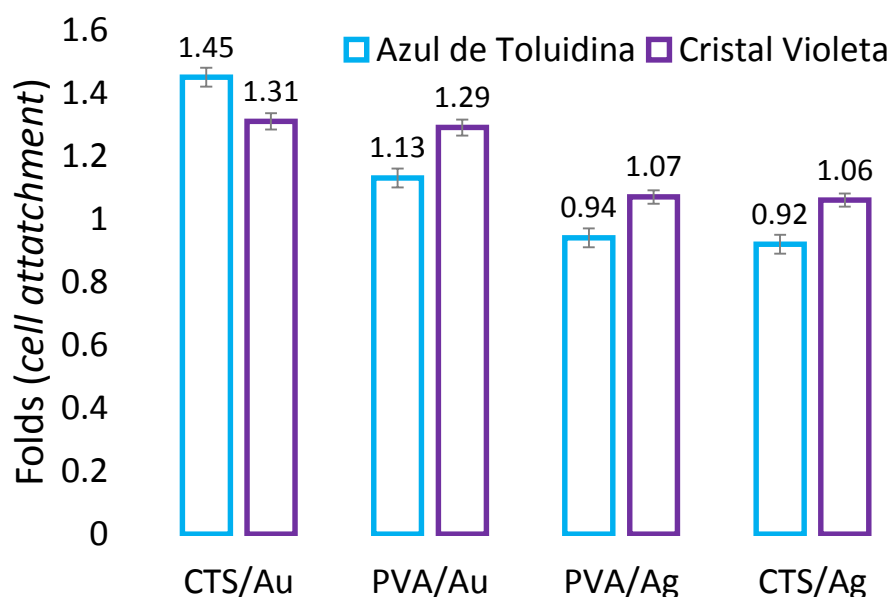


Figura 42. Gráficas comparativas de los compósitos polímero/AuNPs respecto al control.

El análisis de estos resultados evidencia la adecuada biocompatibilidad de ambos soportes CTS/AuNPs y PVA/AuNPs, al presentar una mayor densidad óptica lo cual es un indicativo de una mayor cantidad de células soportadas en los compósitos, mientras que los compósitos con AgNPs presentan poblaciones celulares ligeramente inferiores con respecto a los compósitos que contienen AuNPs, no obstante, los resultados obtenidos representan un buen grado de biocompatibilidad lo que no comprometa la función del tejido vivo para estas condiciones de cultivo en la línea celular HT-29.

Los resultados obtenidos fueron validados con el ensayo con cristal violeta de los cuales a partir de las lecturas de densidad óptica fue posible observar nuevamente la mayor afinidad de las células de adenocarcinoma de colon por las matrices celulares polímero/AuNPs con respecto a las combinaciones polímero/AgNPs.

Tomando como referencia los resultados del ensayo de adhesión fue posible confirmar de manera experimental la biocompatibilidad de los compósitos, siendo más afines a las células epiteliales de intestino los compósitos CTS/AuNPs y PVA/AuNPs los cuales pueden funcionar adecuadamente como andamios para el cultivo de células de epitelio intestinal.

4.8.2 Viabilidad/Citotoxicidad

El método más accesible para la evaluación de viabilidad es el ensayo MTT, que como resultado de la actividad mitocondrial permite estimar el porcentaje de viabilidad, y de manera indirecta el porcentaje de citotoxicidad. En cultivos de 48 h (Figura 43) fue realizado el ensayo MTT por triplicado con los materiales a base de polímeros, siendo las combinaciones analizadas las siguientes: PVA/Ag 0.05 % p/v, CTS/Ag 0.05 % p/v, PVA/ Au 0.05 % p/v y CTS/Au 0.05 % p/v, de las cuales se presentan los resultados estadísticos en la Tabla 4 y de manera gráfica en el histograma de la Figura 44.

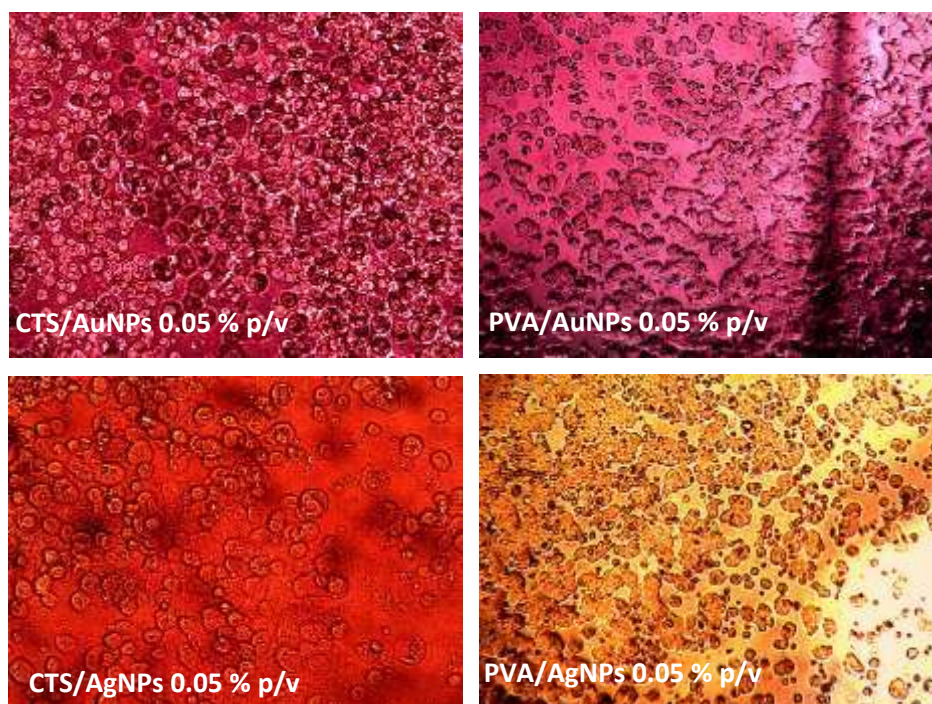


Figura 43. Imágenes de las células HT-29 a 48 h de incubación sobre los materiales compuestos, imágenes obtenidas mediante el software Motic Images Plus 2.0.

Tabla 4. Resumen de resultados estadísticos obtenidos del ensayo MTT en materiales polímero/NPMs.

Compósito	PVA/Au	PVA/Ag	CTS/Ag	CTS/Au	Controles	
Media	0.76	0.63	0.46	0.87	(C+)	0.6505
DS	0.27	0.23	0.08	0.07	(C-)	0.3985
%CV	30.83	37.11	16.79	8.85		

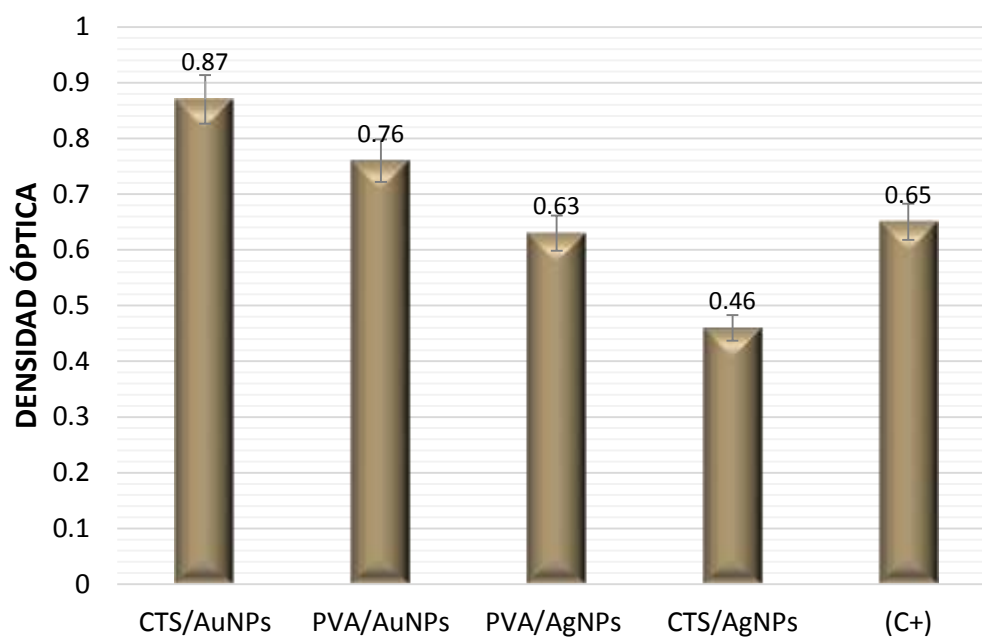


Figura 44. Resultados del ensayo MTT en función de la densidad óptica.

El número de células fue estimado a partir de la Ecuación 3 obtenida del ensayo preliminar (Apéndice B) mientras que el porcentaje de viabilidad fue calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Densidad óptica de células tratadas}}{\text{Densidad óptica de células control}} \cdot 100$$

Tabla 5. Resultados de viabilidad y número de células estimados a partir de los resultados de densidad óptica.

Compósito	Densidad Óptica	% Viabilidad	No. de Células
PVA/Ag	0.63	97.06	241,669.55
CTS/Ag	0.46	70.69	119,192.52
PVA/Au	0.76	116.32	414,921.52
CTS/Au	0.87	134.10	655,534.43

Acorde con los resultados de adhesión, los materiales que presentaron mayor viabilidad para el cultivo de células HT-29 fueron los compósitos con nanopartículas de oro, sin embargo, aun cuando los resultados de los compósitos con plata se encuentran ligeramente debajo del control positivo, estas matrices resultan tolerables a periodos de exposición largos sin ejercer efectos citotóxicos. En las Figuras 45 y 46 se observan las gráficas comparativas expresadas en porcentaje de viabilidad y número de células de la interpretación de los resultados del ensayo de viabilidad MTT.

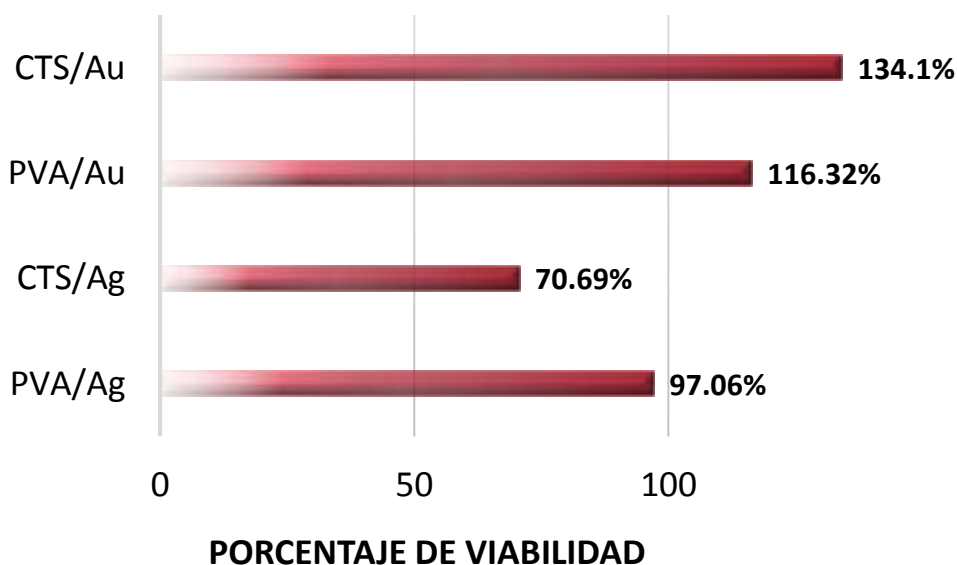


Figura 45. Gráfica comparativa de los porcentajes de viabilidad.

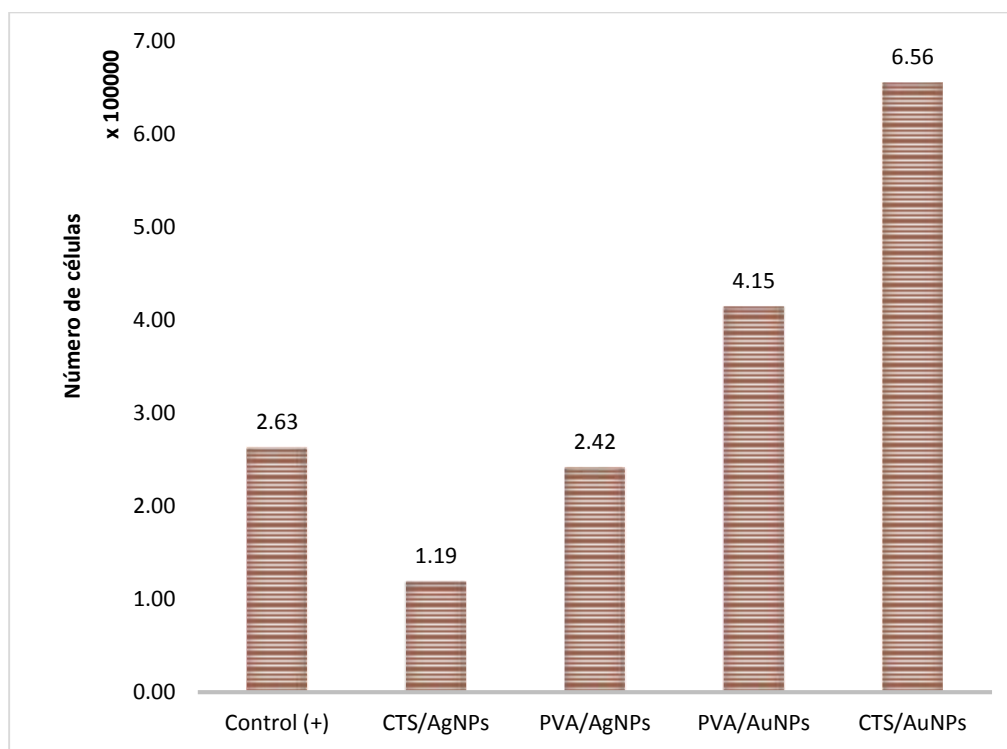


Figura 46. Gráfica comparativa de proliferación.

Los resultados de viabilidad/citotoxicidad de los compósitos obtenidos por el método fotoinducido por exposición a la radiación solar sustentan que la combinación CTS/AuNPs resulta ser la más eficiente, seguida por el compósito PVA/AuNPs, mientras que ligeramente debajo del control positivo se ubica el compósito PVA/AgNPs y finalmente el material CTS/AgNPs. A diferencia de los materiales con plata, los materiales con oro, además de ser biocompatibles permiten la proliferación de células HT-29.

Los resultados de los compósitos PVA/AgNPs y CTS/AgNPs al ubicarse por bajo del control positivo no refieren citotoxicidad, sin embargo restringen el espectro de aplicaciones que puedan comprometer la función metabólica celular y un ligero grado de citopanogenicidad en periodos largos de contacto, siendo posible la aplicación de estos compósitos como materiales de recubrimiento o aplicación tópica en donde ejerzan su alta capacidad microbicida sin comprometer la correcta proliferación celular.

El desarrollo de la nanotecnología ha traído consigo el diseño de sofisticadas herramientas, tanto para la profilaxis y tratamiento como para la innovación de estrategias de diagnóstico temprano de ciertas enfermedades, donde los metales a nanoescala ofrecen múltiples ventajas; no obstante la bioseguridad de los nanomateriales compuestos sigue sin ser del todo esclarecida,

es por ello que en aras de evaluar el riesgo de citotoxicidad en el tejido expuesto se han realizado múltiples estudios *in vitro* en distintas líneas celulares como: fibroblastos, células epiteliales, macrófagos y células de melanomas, con los cuales se ha aportado evidencia contundente sobre la viabilidad de los cultivos celulares expuestos a nanopartículas que presentan diámetros de alrededor de 15 nm, donde también se ha demostrado que nanopartículas de diámetros menores a 4 nm resultan altamente tóxicas para las mismas líneas celulares,² considerando además la dosis de nanopartículas presentes en el compósito, existen concentraciones seguras para el manejo seguro y eficiente de estos biomateriales.⁵

A partir de estos ensayos en tejidos vivos han surgido otros hallazgos sobre los materiales estabilizantes y soportes empleados para la obtención de compósitos polímero/NPMs, de manera que gran parte del carácter citotóxico de las nanopartículas de oro o plata es atribuida al uso de polímeros como PAA, PAH o PMA, mientras que el empleo biopolímeros en el proceso puede reducir significativamente la citotoxicidad;³¹ así, los resultados de adhesión y viabilidad de los compósitos generados en soluciones poliméricas mediante el proceso fotoinducido propuesto en este trabajo presentan características adecuadas para su aplicación en medicina, siendo posible la generación de andamios, sistemas para marcaje celular y liberadores de agentes terapéuticos, así como recubrimientos antimicrobianos eficientes.

4.8 Influencia de la Naturaleza Química del Polímero Empleado como Reductor

El uso de soluciones poliméricas como agentes reductores en la síntesis de NPMs representa una alternativa eficiente y ecológica para la obtención de materiales híbridos polímero/NPMs. Siendo un método basado en la reducción química de sales metálicas, la capacidad de reducción de cada polímero resulta de vital importancia para el proceso, ya que las propiedades finales de las NPMs dependerán de este potencial repercutiendo directamente en las aplicaciones finales del compósito mismo.

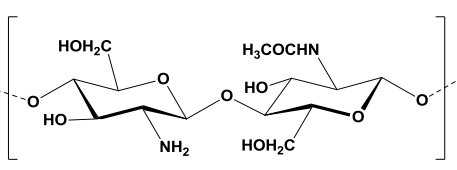
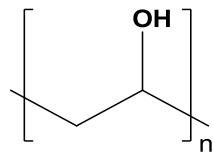
En la Tabla 6 se resumen los principales atributos de las nanopartículas de oro y plata, obtenidas a partir de la reducción empleando ya sea CTS o PVA, polímeros que además de diferir en su origen presentan marcadas diferencias estructurales.

El potencial de reducción ejercido por el polímero en cuestión depende de la presencia de grupos electrodonadores adyacentes a la cadena central del polímero. Así, los grupos hidroxilo presentes en ambos polímeros son responsables del proceso de transferencia de electrones para la reducción del correspondiente ion metálico. No obstante, el quitosano posee grupos amino en sus unidades D (glucosamina) que favorecen las interacciones con el ion metálico y son la principal ventaja que presenta el quitosano con respecto al alcohol polivinílico. Al presentar mayor capacidad de reducción, fue posible preparar soluciones de quitosano conteniendo concentraciones menores de este biopolímero (1.5 % p/v) en comparación con las soluciones de

PVA, las cuales llegan a contener 8 %p/v. La exposición a la radiación solar directa para inducir la reducción de las sales metálicas puede emplearse de manera eficiente controlando el tiempo de exposición y vigilando el IUV para una zona geográfica específica. La radiación del IUV correspondiente al factor 10 de la escala internacional instituida en décadas pasadas por la OMS y la OMM, resultó la más adecuada para estas preparaciones con 30 minutos de exposición como tiempo mínimo requerido para lograr la máxima reducción en ambas soluciones (CTS y PVA).

Las preparaciones en medios poliméricos favorecieron la generación de NPMs con morfología esférica cuya resonancia de plasmones superficiales originó bandas de absorción en el espectro visible entre 412 y 415 nm para las AgNPs y 520-530 nm para las AuNPs lo que sugirió diferencias en el diámetro promedio de las NPMs generadas. En congruencia con el enunciado anterior las imágenes de TEM demuestran que las soluciones al 1.5 % p/v de CTS generan nanopartículas de menor diámetro con respecto a aquellas que se obtienen en soluciones de PVA al 8 % p/v.

Tabla 6. Resumen de los resultados.

Estructura química	 <p style="text-align: center;">CTS</p>		 <p style="text-align: center;">PVA</p>	
Concentración óptima del polímero en la solución	1.5 % p/v		8 % p/v	
Tiempo requerido	30 min		30 min	
IUV	10		10	
Compósito	CTS/AgNPs	CTS/AuNPs	PVA/AgNPs	PVA/AuNPs
λ_{max}	412 nm	520 nm	415 nm	530 nm
Diámetro promedio	15 nm	8 nm	17 nm	12 nm
DS	2.3	2.9	2.0	2.8
Morfología	esférica	esférica	esférica	esférica

A pesar de la excelente capacidad como agente reductor que ejerce el CTS sobre las sales metálicas, la obtención de un material final en forma de nanofibras es una tarea complicada dada la alta estabilidad química de las cadenas del biopolímero CTS que originan estructuras cristalinas complejas, siendo crucial para el proceso de electrospinning la ruptura de las interacciones que mantienen la rigidez de su estructura cristalina. De tal forma que es necesario el uso de sistemas de disolventes como ATF/CH₂Cl₂ con la finalidad de obtener nanofibras con alta concentración de quitosano. En contraste con lo anterior, el electrohilado de soluciones de PVA y la producción de compósitos PVA/NPMs en forma de nanofibras es un proceso sencillo que no requiere tratamientos adicionales para el compósito obtenido en solución durante el proceso de foto-reducción y es posible su electrohilado en solución acuosa lo que reduce riesgos en el uso de disolvente indeseables para su aplicación final.

Los parámetros que se optimizaron para el proceso de electrospinning se resumen en Tabla 10, difiriendo únicamente en la distancia necesaria entre los electrodos para procesar las soluciones de CTS y las soluciones CTS/NPMs. Las nanofibras de los compósitos CTS/NPMs presentan diámetros promedio de 400 nm, las cuales presentan nanopartículas inmersas en el polímero y soportadas en la parte exterior dispersas uniformemente. Por su parte, las nanofibras de PVA/NPMs presentan diámetros promedio de 170 nm y se aprecian nanopartículas embebidas a lo largo de las nanofibras a manera de puntos luminiscentes por el contraste generado con electrones retrodispersados.

El método de reducción fotoinducida en solución polimérica presenta múltiples ventajas que favorecen la biocompatibilidad de los compósitos en forma de películas delgadas, las cuales lograron mimetizar la estructura extracelular para el cultivo de células HT-29 e inducir la proliferación celular en el caso de los compósitos polímero/AuNPs.

A su vez, los compósitos polímero/AgNPs mostraron crecimiento celular por debajo del control positivo sin que este llegue a representar riesgo de citotoxicidad para periodos de incubación de 48 h.

La alta biocompatibilidad y la baja citotoxicidad que ejercen los compósitos generados mediante éste método dirigen hacia el estudio de novedosas aplicaciones en el ámbito biomédico, de las combinaciones ensayadas destacan los compósitos polímero/AuNPs, de los cuales por su versatilidad y facilidad de procesamiento sobresalen los compósitos PVA/AuNPs.

Tabla 7. Resumen de los parámetros de electrohilado y características finales de las colecciones de nanofibras.

Compósito		AgNPs		AuNPs	
		CTS	PVA	CTS	PVA
Concentración del polímero		8 % p/v	8 % p/v	8 % p/v	8 % p/v
Proceso de Electrospinning	Disolvente	ATF/CH ₂ Cl ₂	H ₂ O	ATF/CH ₂ Cl ₂	H ₂ O
	Temperatura	40°C			
	Flujo	0.01 mL/min			
	Distancia	15 cm	10 cm	15 cm	10 cm
	Voltaje	20 kV			
Diámetro promedio		400 nm	170 nm	400 nm	170 nm
Disposición de las NPMs		Embebidas Soportadas	Embebidas	Embebidas Soportadas	Embebidas
Procesamiento directo posterior a la foto-reducción		No	Sí	No	Sí
% Viabilidad		70.69	97.06	134.1	116.32

5. CONCLUSIONES

La síntesis de nanopartículas metálicas en medios poliméricos es posible mediante el proceso de fotorreducción con radiación solar directa, a lo largo del proceso el polímero ejerce de manera adecuada la función de agente reductor, dispersante, estabilizante y finalmente de soporte para el material compuesto final. Esta estrategia de reducción anula el consumo de energías artificiales para inducir el proceso, además de disminuir el consumo de reactivos adicionales al polímero para la reducción de sales metálicas comúnmente empleadas.

Para dicho proceso de reducción fotoinducida de los precursores empleados, en concentraciones de 0.01 a 5 %p/v, las concentraciones de los polímeros a las cuales ejercen mayor eficiencia para la producción de NPMs son CTS 1.5 %p/v y PVA 8 %p/v. Concentraciones menores aumentan la probabilidad de una mayor distribución en el tamaño de las nanopartículas, mientras que las concentraciones mayores a las antes señaladas dificultan el proceso de dispersión y comprometen la distribución homogénea de tamaño de partícula.

La naturaleza química del polímero que se emplea como único agente reductor influye directamente en las características finales de las nanopartículas generadas, siendo de menor dimensión las que se obtienen a partir de las soluciones de quitosano, el cual ejerce mayor efecto reductor por la presencia tanto de grupos $-OH$ como $-NH_2$ que facilitan el proceso de reducción en contraste con las soluciones de PVA. Tal y como lo sugiere el análisis por FT-IR, estos grupos funcionales mantienen una fuerte interacción con las nanopartículas metálicas en los compósitos.

La morfología y dimensión sugeridas por la forma y localización de las bandas de RPS se corroboraron con las imágenes de TEM que ponen de manifiesto la capacidad de ambos polímeros como reductores y estabilizantes para la formación de NPMs con morfologías uniformes. Asimismo, la presencia de nanopartículas de plata y oro se corroboró mediante XPS, donde fue posible apreciar las componentes de los acoplamientos spin-orbital característica de plata nanométrica.

Derivado del análisis mediante FE-SEM se observa que tanto las películas como las nanofibras generadas a partir de las soluciones reducidas *in situ* presentan buena distribución de las nanopartículas en el soporte polimérico, en el caso de las nanofibras, las condiciones de electrohilado son las adecuadas para el proceso de electrospinning al no evidenciar defectos en las colecciones de nanofibras.

La morfología y dimensión resultantes en las NPMs resultan adecuadas para su aplicación en medicina, siendo destacable la elevada biocompatibilidad de los soportes polímero/NPMs, destacando las combinaciones polímero/AuNPs las cuales incluso promueven la proliferación celular en la línea HT-29.

Los resultados experimentales sobre la biocompatibilidad y citotoxicidad marcan la pauta para el estudio y desarrollo de aplicaciones que involucren la regeneración de tejido, liberación

de agentes terapéuticos, señalización de tejidos, entre otras, con muy buenas expectativas. No obstante las múltiples ventajas que presenta el quitosano para la aplicación en medicina, la facilidad que ofrece en el procesamiento del alcohol polivinílico posibilita la generación de compósitos en forma de nanofibras libres de agente tóxicos, altamente deseables para dichas aplicaciones biomédicas.

Los resultados de solubilidad de los soportes en forma de nanofibras evidencian la necesidad del diseño de soportes electrohilados resistentes a medios acuosos con la finalidad de analizar las aplicaciones *in vitro*. Así mismo, el electrohilado de nanofibras de quitosano en condiciones más inocuas sigue siendo un reto experimental con miras a aportar en el diseño y aplicación de materiales que lo integren como componente mayoritario aprovechando los múltiples beneficios que se le atribuyen.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Uddin M. J., Middy T. R., Chaudhri B. & Sakata H. (2014). Destruction of percolative network using green synthesized gold nanoparticles: Formation of high dielectric material. *Polymer* 55: 15-21.
2. Youssef A. M., Abdel-Aziz M. S. & El-Sayed S. (2014). Chitosan nanocomposite films based on Ag-NP and Au-NP biosynthesis by *Bacillus Subtillis* as packaging materials. *International Journal of Biological Macromolecules* 69: 185-191.
3. Varsha T., Yallapu M. M., Sreedhar B. & Bajpai S. K. (2009). Fabrication, Characterization of Chitosan/Nanosilver Film and Its Potencial Antibacterial Application. *Journal of Biomaterials Science* 20: 2129-2144.
4. Hadipour-Goudarzi E., Monztazer M., Latifi M. & Ghare Aghaji A. A. (2014). Electrospinning of Chitosan/Sericin/PVA Nanofibers Incorporated with In Situ Synthesis of Nano Silver. *Carbohydrate Polymers* 113: 231-239.
5. Krstić J., Spasojević J., Radosavljević A., Šiljegović M. & Kačarević-Popović Z. (2014). Optical and Structural Properties of Radiolytically In Situ Synthesized Silver Nanoparticles Stabilized by Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) blends. *Radiation Physics and Chemistry* 96: 158-166.
6. Bhattacharyya D., Singh S., Satnalika N., Khandelwal A. & Jeon S. H. (2009). Nanotechnology, Big Things from a Tiny World: A Review. *International Journal of u- and e- Service, Science and Tehnology* 2(3): 29-38.
7. Regiel-Futyr A., Kus-Liśkiewicz M., Sebastian V., Irusta S., Arruebo M., Stochel G. & Kyziol A. (2015). Development of Noncytotoxic Chitosan-Gold Nanocomposite as Efficient Antibacterial Materials. *ACS Applied Materials & Interfaces* 7: 1087-1099.
8. Anisha B. S., Biswas R., Chennazhi K. P. & Jayakumar R. (2013). Chitosan-Hyaluronic Acid/Nano Silver Composite Sponges for Drug Resistant Bacteria Infected Diabetic Wounds. *International Journal of Biological Macromolecules* 62: 310-320.
9. Chithrani B. D. & Chan W. C. (2007). Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Size and Shapes. *Nano Letter* 7: 1542-1550.
10. Askeland D. R. & Wright W. J. (2014). *The Science and Engineering of Materials*. 7th Edition. Boston USA; CENGAG Learning.
11. Bergmann C. P. & Stumpf A. (2013). *Dental Ceramics*. New York, NY; Springer.
12. Chawla K. K. (2013). *Composite Materials*. 3th Edition. New York NY; Springer.
13. Mati-Baouche N., Elchinger P. H., de Baynast H., Pierre G., Delattre C. & Michaud P. (2014). Chitosan as an Adhesive. *European Polymer Journal* 60: 198-212.
14. Yang T. L. (2011). Chitin-Based Materials in Tissue Engineering: Applications in Soft Tissue and Epithelial Organ. *International Journal of Molecular Sciences* 12: 1936-1963.

15. Yang Y., Wang S., Wang Y., Wang X., Wang Q. & Chen M. (2014). Advances in Self-Assembled Chitosan Nanomaterials for Drug Delivery. *Biototechnology Advances* 32: 1301-1316.
16. Goy R. C., de Britto D. & Assis O. B. G. (2009). A Review of Antimicrobial Activity of Chitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 19(3): 241-247.
17. Douglas T. E. L., Piegat A., Declercq H. A., Schaubroeck D., Balcaen L., Bliznuk V., de Meyer B., Vanhaecke F., Cornelissen R., El Fray M. & Dubruel P. (2014). Composites of Polyvinyl alcohol (PVA) Hydrogel and Calcium and Magnesium Phosphate Formed by Enzymatic Functionalization. *Materials Letters* 137: 62-67.
18. Baker M. I., Walsh S. P., Schwartz Z. & Boyan B. D. (2012). A Review of Polyvinyl alcohol and its Uses in Cartilage and Orthopedic Applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 100B (5): 1451-1457.
19. Gonzalez J. S. & Alvarez V. A. (2014). Mechanical Properties of Polyvinyl Alcohol / Hydroxyapatite Cryogel as Potential Artificial Cartilage. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 34: 47-56.
20. Brigante D. (2014). *New Composite Materials: Selection, Design and Application*. New York NY; Springer.
21. Mody V. V., Siwale R., Singh A. & Mody H. R. (2010). Introduction to Metallic Nanoparticles. *Journal of Pharmacy & BioAllied Science* 2(4): 282-289.
22. Turkevich J. (1985). *Gold Bull.* 18: 125-131.
23. Thanh N. T. K., Maclean N. & Mahiddine (2014). Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. *Chemical Reviews* 114: 7610-7630.
24. Wei X., Luo M., Li W., Yang L., Liang X. & Xu L. (2012). Synthesis of Silver Nanoparticles by Solar Irradiation of Cell-Free *Bacillus amyloliquefaciens* Extracts and AgNO₃. *Bioresurce Technology* 103: 273-278.
25. Hyllested J. Æ., Espina-Palanco M., Hagen N., Bo Mogensen K. & Kneipp K. (2015). Green Preparation and Spectroscopic Characterization of Plasmonic Silver Nanoparticles Using Fruit as Reducing Agents. *Beilstein Journal of Nanotechnology* 6: 293-299.
26. Nakkala J. R., Bhagat E., Suchiang K. & Sadras S. R. (2015). Comparative Study of Antioxidant Catalytic Activity of Silver and Gold Nanoparticles Synthesized From *Costus pictus* Leaf Extract. *Journal of Materials Science & Technology*. 31: 986-994.
27. Tajdidzadeh M., Azmi B. Z., Yuns W. M. M., Talib Z. A., Sadrolhosseini A. R., Karimzadeh K., Gene S. A. & Dorraj M. (2014). Synthesis of Silver Nanoparticles Dispersed in Various Aqueous Media Using Laser Ablation. *Journal of Nanomaterials* ID 324921: 1-7.
28. Zhang J., Yuan Y., Wang Y., Sun F., Liang G., Jiang Z. & Yu S. H. (2015). Microwave Assisted Synthesis of Photoluminescent Glutathione Capped Au/Ag Nanoclusters: A Unique Sensor on a Nanoparticle for Metal Ions, Anions and Small Molecules. *Nano Research* 8(7): 2329-2339.

29. Mohd-Yusof N. S. & Ashokkumar M. (2015). Sonochemical Synthesis of Gold Nanoparticles by Using High Intensity Focused Ultrasound. *ChemPhysChem* 16: 775-781.
30. Stewart A., Murray S. & Bell S. E. J. (2015). Simple preparation of Positively Charged Silver Nanoparticles for Detection of Anions by Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Analyst* 140: 2988-2994.
31. Ishiara M., Nguyen V. Q., Mori Y., Nakamura S. & Hattori H. (2015) Adsorption of Silver Nanoparticles onto Different Surface Structures of Chitin/Chitosan and Correlations with Antimicrobial Activities. *International Journal of Molecular Sciences* 16(6): 13973-13988.
32. Tan B., Sun L., Li J., Zhang M & Wang X. (2015). Sunlight Driven Synthesis of Anisotropic Silver Nanoparticles. *Chemical Engineering Journal* 260: 99-106.
33. Ulug B., Turkdemir M. H., Cicek A. & Mete A. (2015). Role of Irradiation in the Green Synthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Fig (*Ficus carica*) Leaf Extract. *Spectrochimica Acta Part A: Macromolecular and Biomolecular Spectroscopy* 135: 153-161.
34. Prathna T. C., Raichur A. M., Chandrasekaran N. & Mukherjee A. (2014). Sunlight Irradiation Induced Green Synthesis of Stable Silver Nanoparticles Using *Citrus limon* Extract. *Proceedings of National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 84(1): 65-70.
35. Annadhasan M., Kasthuri J. & Rajendiran N. (2015). Green Synthesis of Gold Nanoparticles under Sunlight Irradiation and their Colorimetric Detection of Ni²⁺ and Co²⁺ Ions. *RSC Advances* 5: 11458-11468.
36. Hebbalalu D., Lalley J., Nadagouda M. N. & Varma R. S. (2013). Greener Techniques for Synthesis of Silver Nanoparticles Using Plant Extracts, Enzymes, Bacteria, Biodegradable Polymers and Microwaves. *ACS Sustainable Chemistry Engineering* 1: 703-712.
37. Long Y., Ran X., Zhang L., Guo Q., Yang T., Gao J., Cheng H., Cheng T., Shi C. & Su Y. (2013). A Method of Preparation of Silver Nanoparticles Using Commercial Available Carboxymethyl Chitosan and Sunlight. *Materials Letters* 112: 101-104.
38. Bhaduri G. A., Little R., Khomane R. B., Lokhande S. U., Kulkarni B. D., Mendis B. G. & Šiller L. (2013). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Sunlight. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 258 :1-9.
39. Wei X., Luo M., Li W., Yang L., Liang X., Xu L., Kong P. & Liu H. (2012). Synthesis of Silver Nanoparticles by Solar Irradiation of Cell-Free *Bacillus amyloliquefaciens* extracts and AgNO₃. *Bioresource Technology* 103: 273-278.
40. Rastogi L. & Arunachalam J. (2011). Sunlight Based Irradiation Strategy for Rapid Green Synthesis of Highly Stable Silver Nanoparticles Using Aqueous Garlic (*Allium sativum*) Extract and Their Antibacterial Potential. *Materials Chemistry and Physics* 129: 558-563.

41. Celebioglu A., Aytac Z., Umu O. C. O., Dana A., Tekinay T. & Uyar T. (2014). One-Step Synthesis of Size-Tunable Ag Nanoparticles Incorporated in Electrospun PVA/Cyclodextrin Nanofibers. *Carbohydrate Polymers* 99: 808-816.
42. Xu Z., Peng Y., Wantai Y. & Jinchun C. (2008). The Bio-inspired Approach to Controllable Biomimetic Synthesis of Silver Nanoparticles in Organic Matrix of Chitosan and Silver-Binding Peptide (NPSSLFRYLPSD). *Materials Science and Engineering C* 28: 237-242.
43. Kim E. J., Yeum J. H. & Choi J. H. (2014). Effects of Polymeric Stabilizers on the Synthesis of Gold Nanoparticles. *Journal of Materials Science & Technology* 30: 107-111.
44. Helcher H. H. (1718). In Aurum Potabile oder Gold Tinstur. *J. Herbord Klossen: Breslau and Leipzig*.
45. Wang Y., Van der Vyver S., Sharma K. K. & Román-Leshkov Y. (2014). Insights Into the Stability of Gold Nanoparticles Supported on Metal Oxides for the Base-Free Oxidation of Glucose to Gluconic Acid. *Green Chemistry* 16: 719-726.
46. Koczur K. M., Mourdikoudis S., Polavarapu L. & Skrabalak S. E. (2015). Polyvinylporrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. *Dalton Trans* 44: 17883-17905.
47. Shmeli K., Ahmad M. B., Jazayeri S. D., Sedaghat S., Shabanzadeh P., Jahangirian H., Abdollahi Y. (2012). Synthesis and Characterization of Polyethylene Glycol Mediated Silver Nanoparticles by the Green Method. *International Journal of Molecular Sciences* 13(6): 6639-6650.
48. Zhang A. Q., Cai L. J., Sui L., Qian D. J. & Chen M. (2013). Reducing Properties of Polymers in the Synthesis of noble Metal Nanoparticles. *Polymer Reviews* 53: 240-276.
49. Venkatesham M., Ayodhya D., Madhusudhan A., Babu N. V. & Veerabhadram G. (2014). A novel Green One-Step Synthesis of Silver Nanoparticles Using Chitosan: Catalytic Activity and Antimicrobial Studies. *Applied Nanoscience* 4: 113-119.
50. Bai J., Li Y., Du J., Wang S., Zheng J., Yang Q. & Chen X. (2007). One-pot Synthesis of Polyacrylamide Gold Nanocomposite. *Materials Chemistry and Physics* 106: 412-415.
51. Gaddy G. A., Korchev A. S., McLain J. L., Slaten B. L. Steigerwalt E. S. & Mills G. (2004). Light-induced formation of silver particles and clusters in cross linked PVA/PAA films. *Journal of Physical Chemistry B* 108: 14850-14857.
52. Saquing C. D., Manasco J. L. & Khan S. A. (2009). Electrospun Nanoparticle-Nanofibers Composites via a One-Step Synthesis. *Small* 5(8): 944-951.
53. Sakai T. & Alexandridis P. (2004). Single Step Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles in Aqueous Pluronic Block Copolymer Solutions at Ambient Temperature. *Langmuir* 20: 8426-8430.
54. Huang H. Z. & Yang X. R. (2004). Synthesis of Chitosan-Stabilized Gold Nanoparticles in the Absence/Presence of Tripolyphosphate. *Biomacromolecules* 5(6): 2340-2346.
55. Lee M. S., Heo D. N., Moon J. H., Ko W. K., Lee J. B., Bae M. S., Park S. W., Kim J. E., Lee D. H., Kim E. C., Lee C. H. & Kwon I. K. (2014). Electrospun Chitosan Nanofibers with

- Controlled Levels of Silver Nanoparticles. Preparation, Characterization and Antibacterial Activity. *Carbohydrate polymers* 111: 530-537.
56. Boufi S., Rei Vilar M., Ferreira A. M. & Botelho do Rego A. M. (2013). *In situ* Photochemical Generation of Silver and Gold Nanoparticles on Chitosan. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* 439: 151-158.
57. Othman Ali I. (2013). Synthesis and Characterization of Ag⁰/PVA Nanoparticles Via Photo- and Chemical Reduction Methods for Antibacterial Study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* 436: 922-929.
58. Abdelrahman A. M., Hudson S. M. & Rojas O. J. (2014). Antimicrobial Wound Dressing Nanofiber Mats From Multicomponent (Chitosan/Silver-NPS/Polyvinyl Alcohol) Systems. *Carbohydrate Polymers* 100: 166-178.
59. Yang N. & Li W. H. (2015). Preparation of Gold Nanoparticles Using Chitosan Oligosaccharide As a Reducing and Capping Reagent and Their *in vitro* Cytotoxic Effect on Human. *Materials Letters* 138: 154-157.
60. Ehmann H. M. A., Breitwieser D., Winter S., Gspan C., Koraimann G., Maver U., Sega M., Köstler S., Stana Kleinschek K. Spirk S. & Ribitsch V. (2015). Gold Nanoparticles in the Engineering of Antibacterial and Anticoagulant Surfaces. *Carbohydrate Polymers* 117: 34-42.
61. Zhang G., Sun X., Jasinski J., Patel D. & Gobin A. M. (2012). Gold/Chitosan Nanocomposite with Specific Near Infrared Absorption for Photothermal Therapy Applications. *Journal of Nanomaterials* ID 853416: 1-9.
62. Mori Y., Ono T., Miyahira Y., Nguyen V. Q., Matsui T. & Ishihara M. (2013). Antiviral Activity of Silver Nanoparticles/Chitosan Composites Against H1N1 Influenza A Virus. *Nanoscale Research Letters* 8:93 1-6.
63. Bednarski M., Dudek M., Knutelska J., Nowiński L., Sapa J., Zygmunt M., Nowak G., Luty-Błocho M., Wojnicki M., Fitzner K. & Tęśiorowski M. (2015). The Influence of the Route of Administration of Gold Nanoparticles on Tissue Distribution and Basic Biochemical Parameters: *in vivo* Studies. *Pharmacological Reports* 67:405-409.
64. Balasubramanian R. K. (2014). Antibacterial Applications of Polyvinylalcohol-Nanogold Composite Membranes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* 455: 174-178.
65. Omidfar K., Zarei H., Gholizadeh F. & Larijani B. (2012). A High-sensitivity Electrochemical Immunosensor Based on Mobil Crystalline Material-41-Polyvinyl Alcohol Nanocomposite and Colloidal Gold Nanoparticles. *Analytical Biochemistry* 421: 649-656.
66. Mahanta N. & Valiyaveetil S. (2012). *In situ* Preparation of Silver Nanoparticles on Biocompatible Methacrylated Poly(vinyl Alcohol) and Cellulose Based Polymeric Nanofibers. *RSC Advances* 2: 11389-11396.

67. Eghbalifam N., Frounchi M. & Dadbin S. (2015). Antibacterial Silver Nanoparticles in Polyvinyl Alcohol/Sodium Alginate Blend Produced by Gamma Irradiation. *International Journal of Biological Macromolecules* 80: 170-176.
68. Eisa W. H., Abdel-Moneam Y. K., Shabaka A. A. & M. Hosam A. E. (2012). *In situ* Approache Induced Growth of Highly Monodispersed Ag Nanoparticles Within Free Standing PVA/PVP Films. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomoleclar Spectroscopy* 95: 341-346.
69. Barani H. (2014). Antibacterial Continuous Nanofibrous Hybrid Yarn Through In Situ Synthesis of Silver Nanoparticles: Preparation and Characterization. *Materials Science and Engineering C* 43: 50-57.
70. Kiyak Y. E. & Cakmak E. (2014). Review Nanofibers Production Methods. *Electronic Journal of Textile Technologies* 8(3): 49-60.
71. Liu H., Ding X., Zhou G., Li P., Wei X. & Fan Y. (2013). Review Article: Electrospinning of Nanofibersfor Tissue Engineering Applications. *Journal of Nanomaterials* ID 495708; 1-11.
72. Li D. & Xia Y. (2004). Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel? *Advanced Materials* 16(14): 1151-1170.
73. Li Z. & Wang C. (2013). *One-Dimensional Nanostructures: Electrospinning Technique and Unique Nanofibers*. New York NY; Springer.
74. Persano L., Camposeo A., Tekmen C. & Pisignano D. (2013). Industrial Upscaling of Electrospinning and Applications of Polymer Nanofibers: A review. *Macromolecular Materials and Engineering* 298: 504-520.
75. Soenen S. J., Parak W. J., Rejman J. & Manshian B. (2015). (Intra)Cellular Stability of Inorganic Nanoparticles: Effects on Cytotoxicity, Particle Funcionality, and Biomedical Applications. *Chemical Reviews* 115: 2109-2135.
76. Tian F., Clift M. J. D., Casey A., del Pino P., Pelaz B., Conde J., Byrne H. J., Tothen-Rutishauser, Estrada G., de la Fuente J. M. & Stoeger T. (2015). Investigating the Role of Shape on the Biological Impact of Gold Nanoparticles *in vitro*. *Future Medicine Ltd.* 1-16.
77. Samberg M E., Mente P., He T., King M. W., & Monteiro-Riviere N. A. (2013). In vitro Biocompatibility and Antibacterial Efficacy of a Degradable Poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) Copolymer Incorporated with Silver Nanoparticles. *Annals of Biomedical Engineering* 42(7): 1482-1493.
78. Pérez-Díaz M., Alvarado-Gomez E., Magaña-Aquino M., Sánchez-Sánchez R., Velasquillo C., González C., Ganem-Rondero A., Martínez-Castañón G., Zavala-Alonzo N. & Martínez-Gutierrez F. (2016). Anti-Biofilm Activity of Chitosan Gels Formilated with Silver Nanoparticles and Their Cytotoxic Effect on Human Fibroblasts. *Materials Science and Engineering: C*. 60: 317-323.

79. Mohanty S., Mishra S., Jena P., Jacob B., Sarkar B. & Sonawane A. (2012). An Investigation on the Antibacterial Cytotoxic, and Antibiofilm Efficacy of Starch-Stabilized Silver Nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 8(6) 916-924.
80. Vijayakumar S. & Ganesan S. (2012). In Vitro Cytotoxicity Assay on Gold Nanoparticles with Different Stabilizing Agents. *Journal of Nanomaterials* ID 734398; 1-9.
81. Suarasan S., Focsan M., Soritau O., Manui D. & Astilean S. (2015). One Pot, Green Synthesis of Gold Nanoparticles by Gelatin and Investigation of Their Biological Effects on Osteoblast Cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 132: 122-131.
82. Morales Luckie R. A., Sánchez Mendieta V., Olea Mejía O., Vilchis Nestor A. R., López Tellez G., Varela Guerrero V., Huerta L. & Arenas Alatorre J. (2013). Facile Solventless Synthesis of a Nylon-6,6/Silver Nanoparticles Composite and Its XPS Study. *International Journal of Polymer Science* ID 235850: 1-8.
83. Larrude D. G., Maia da Costa M. E. H. & Freire Jr. F. L. (2014). Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticle-Multiwalled Carbon Nanotube Composite. *Journal of Nanomaterials* ID 654068: 1-7.
84. Mudimela P. R., Scardamaglia M., González-León O., Reckinger N., Snyders R., Llobet E., Bittencourt C. & Colomer J. F. (2014). Gas Sensing with Gold-decorated Vertically Aligned Carbon Nanotubes. *Belstein Journal of Nanotechnology* 5: 910-918.

7. APÉNDICES

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES POLIMÉRICAS

a) Soluciones de quitosano (CTS) 1.5 % p/v

Inicialmente se prepara una solución de ácido acético al 1 % v/v. Para obtener 250 mL de solución se requieren 2.5 mL de ácido acético glacial y aforar a 250 mL con agua destilada. De ser necesario se conserva en frasco de vidrio en un lugar fresco.

Solución de CTS 1.5 % p/v: para 250 mL de solución se pesan 3.75 g de CTS y se añaden 250 mL de la solución de ácido acético preparada al 1 % v/v. La solución se deja en agitación constante por 24 h (agitador magnético a velocidad de 6 rpm). Antes de usar se debe dejar reposar la solución 24 h para la sedimentación del quitosano que no solubilizó.

Cálculos

$$\% \text{ peso/volumen} = \frac{\text{masa soluto (g)}}{\text{volumen de disolución (mL)}} * 100$$

$$\text{Masa soluto (g)} = \frac{1.5 \% \text{ peso/vol} * 250 \text{ mL de disolución}}{100}$$

b) Soluciones de alcohol polivinílico (PVA) 8 % p/v

Solución de PVA 8 % p/v: para 250 mL de solución se pesan 20 g de PVA y se disuelve en 250 mL de agua destilada. La solución se deja en estufa hasta disolución completa a 90°C (aproximadamente 4 h sin ser necesaria su agitación).

Cálculos

$$\% \text{ peso/volumen} = \frac{\text{masa soluto (g)}}{\text{volumen de disolución (mL)}} * 100$$

$$\text{Masa soluto (g)} = \frac{8\% \text{ peso/vol} * 250 \text{ mL de disolución}}{100}$$

SÍNTESIS DE LOS COMPÓSITOS POLÍMERO/NPMs

Para el proceso de foto-reducción de sales metálicas en el medio polimérico se pesan 25 g de la solución polimérica y se adiciona la sal metálica según la concentración requerida de acuerdo a la Tabla A1.

Tabla A1. Concentraciones para la reducción de sales metálicas.

Concentración de la sal (% p/v)	Peso en gramos
3	0.75
2	0.5
0.05	0.0125
0.025	0.0063
0.02	0.005
0.015	0.0038
0.01	0.0025
0.005	0.0013
0.001	0.0003

La mezcla de los reactivos se hace con agitación suave y de ser necesario se coloca en ultrasonido a temperatura ambiente por 5 minutos protegida de la luz. Una vez que se ha dispersado homogéneamente y que se ha comprobado el factor 10 del índice UV, la solución se expone a la radiación solar directa por 30 min corroborando la formación de nanopartículas metálicas en el espectrofotómetro de UV-vis a 420 nm para las AgNPs y 520 nm AuNPs.

OBTENCIÓN DE PELÍCULAS DELGADAS

La formación de películas delgadas se realiza por el método de evaporación del solvente, para ello se vierten 7 ± 1 g de las soluciones reducidas en cajas Petri de 10 cm de diámetro y se colocan en estufa a 60°C por 8 h (sin tapa).

Transcurrido ese lapso se retiran con cuidado las películas delgadas y se preservan dentro de la caja Petri protegidas de la luz.

OBTENCIÓN DE NANOFIBRAS POR ELECTROSPINNING

El proceso de electrospinning para los compósitos PVA/NPMs se realiza directamente de la solución reducida. El procesamiento de los compósitos CTS/NPMs se lleva a cabo disolviendo la película delgada obtenida por evaporación del solvente en un sistema de disolventes compuesto

por ácido trifluoroacético (ATF)/dicloro metano (CH_2Cl_2) (70:30) quedando a una concentración final del 8 % p/v con respecto al peso del compósito. Para ello se registra el peso de cada película de los compósitos CTS/NPMs.

$$\% \text{ peso/volumen} = \frac{\text{masa soluto (g)}}{\text{volumen de disolución (mL)}} * 100$$

$$\text{Masa soluto (g)} = \frac{8\% \text{ peso/vol} * 20 \text{ mL de disolución}}{100}$$

Para el proceso de electrospinning se requiere llenar la jeringa hasta el volumen máximo, posteriormente conectar la manguera que se colocará en el soporte, siendo necesario cubrir la manguera con cinta aislante, para después conectarla al electrodo.

Se emplea un colector plano el cual debe estar recubierto con papel aluminio, éste se conecta al electrodo opuesto y a tierra y se coloca a la distancia establecida por el diseño del experimento. Se verifica el paso de corriente eléctrica con un voltímetro, una vez listo se cierra la puerta del equipo y se enciende, verificando el correcto funcionamiento del extractor, posteriormente se establecen los parámetros de operación a excepción del voltaje.

Se enciende la bomba y se configura la velocidad de inyección, entonces se incrementa paulatinamente el voltaje hasta 10 kV, cuando aparece la primera gota en la punta de la aguja se incrementa el voltaje que no debe exceder los 25 kV para el buen funcionamiento del equipo.

Una vez superada la tensión superficial se estabiliza el jet con el control del voltaje, en este punto se procede a supervisar el procesamiento constantemente verificando que no se pierda el jet. Una vez procesado todo el contenido de la jeringa, la colección final de nanofibras se desprende del colector y se preserva en bolsas de plástico protegidas de la luz.



Figura A1. Equipo de electrospinning: NaBond Technologies IIQB-UMSNH.

EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD / VIABILIDAD DE LOS MATERIALES POLÍMERO/NPMs FRENTE A CÉLULAS HT-29

LÍNEA CELULAR HT-29 (ATCC® HTB-38™)

La línea celular HT-29 es una línea adherente de adenocarcinoma de colon humano con morfología epitelial. Estas células son sensibles a los fármacos quimioterapéuticos de 5-fluorouracilo y oxaliplatino, que son las opciones de tratamiento estándar para el cáncer colorrectal. Además de ser un modelo de xenoinjerto de tumor para el cáncer colorrectal, 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. Bajo condiciones estándar de cultivo, estas células crecen como una, de múltiples capas indiferenciada no polarizado.⁸⁵

Tabla A2. Información general⁸⁵.

Designación	HT-29	
Nivel de bioseguridad	1	
Preservación	Congeladas (en hielo seco)	
Propiedades de crecimiento	Adherente	
Organismo	<i>Homo sapiens</i>	
Fuente	Órgano	Colon
	Enfermedad	Adenocarcinoma colorrectal

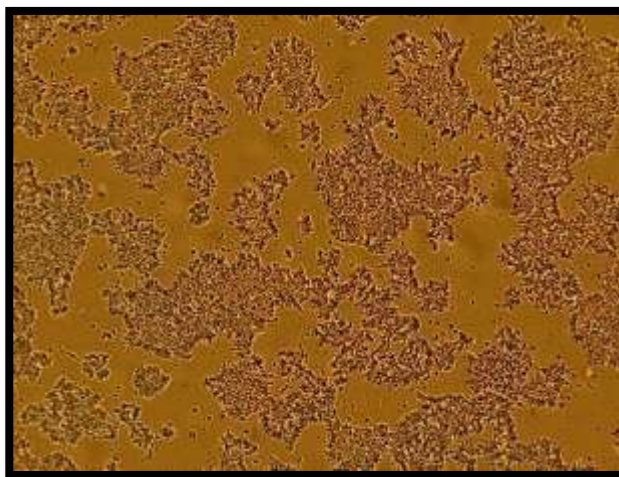


Figura A2. Células HT-29 observadas a 10x a 24 h de cultivo. Imagen obtenida mediante el software Motic Images Plus 2.0.

Tabla A3. Información general de descongelación, propagación y criopreservación de células HT-29⁸⁶.

Cultivo inicial	<ul style="list-style-type: none"> El estabilizante (DMSO) debe ser removido mediante centrifugación. La densidad para sembrar las células HT-29 en viales debe ser de 5×10^5 células/cm² o verter el contenido de un vial en botellas matraz T-25 con 10 mL de medio de crecimiento completo (McCoy's 5A +10 % v/v FBS).
Medio de crecimiento completo	<ul style="list-style-type: none"> El medio completo de crecimiento empleado para expandir los cultivos de células HT-29 es el medio McCoy's 5A + 10 % v/v FBS. El medio de crecimiento completo debe descongelarse antes de ser usado en baño de agua a 35°C por un periodo de 15 a 30 min. Después de 30 min, el medio de crecimiento completo debe llevarse a temperatura ambiente antes de ser usado. El medio completo debe mantenerse entre 2 y 8°C cuando no se está empleando.
Crecimiento celular	<ul style="list-style-type: none"> La temperatura de crecimiento para las células HT-29 es 37°C ±1°C. Se recomienda atmósfera de aire al 5% ±1% CO₂.
Propiedades de crecimiento	La población de células HT-29 se duplica en aproximadamente 23 h.
Requerimientos especiales de crecimiento	<ul style="list-style-type: none"> El subcultivo de células HT-29 debe realizarse cuando la confluencia es de 80 a 90% o cuando la densidad de células es cercana a 5×10^5 células viables/cm².
Medio de subcultivo	<ul style="list-style-type: none"> La tripsinación se debe realizar con solución 0.25 % p/v de Tripsina-0.53 mM EDTA. Los reactivos para el subcultivo deben descongelarse previo a su uso en baño de agua entre 35 y 37°C por un periodo de 15 a 30 min. Después de 30 min, el medio de crecimiento completo debe llevarse a temperatura ambiente antes de ser usado. El medio completo debe mantenerse entre 2 y 8°C cuando no se está empleando.
Método de subcultivo	<ul style="list-style-type: none"> El protocolo de cultivo de células HT-29 se realiza empleando solución 0.25 % p/v de tripsina-EDTA 0.53 mM. La acción enzimática de la solución tripsina-EDTA se detiene cuando se adiciona el medio completo de crecimiento a las células separadas. La relación de división es de 1:10 a 1:12, mientras que la densidad del cultivo a sembrar es entre 4×10^4 y 5×10^4 células viables/cm² para el subcultivo de células HT-29.
Células viables/mL/crio-vial	<ul style="list-style-type: none"> El número de células viables/mL/criovial es: 3×10^6 (rango aceptable: 3.0×10^6 células/mL a 4.0×10^6 células/mL).
Medio de criopreservación	El medio de criopreservación para las HT-29 es el medio de crecimiento completo (McCoy's 5A + 10 % v/v FBS) con 5 % v/v DMSO.

Se emplearon los reactivos y equipos que a continuación se enlistan:

⁸⁶<http://www.atcc.org/Products/HTB38.aspx>
⁸⁶http://physics.cancer.gov/docs/bioresource/colorectal/NCI-PBCF-HTB38_HT-29_SOP-508.pdf

Tabla A4. Especificaciones de equipos y reactivos empleados.

Equipo	Marca
Incubadora	NU4750 NuAire™
Vórtex	LSE Mixer Corner®
Centrífuga	Heraeus Megafuge 40 Thermo Scientific
Campana de flujo laminar	NU126-300 NuAire™
Microscopio invertido	Eclipse TS100 Nikon
Espectrofotómetro lector de microplacas	xMark BioRad
Micropipetas	Eppendorf™

Reactivo	Referencia	Marca
<i>Azul Tripán</i>	T6146	Sigma-Aldrich
<i>Cristal Violeta</i>	C0775	Sigma-Aldrich
<i>Azul de Toluidina</i>	89640	Sigma-Aldrich
<i>TRI Reagent®</i>	T9424	Sigma-Aldrich
<i>Kit MTT</i>	CGD1	Sigma-Aldrich
<i>Penicilina/Estreptomicina</i>	P4333	Sigma-Aldrich
<i>Suero Fetal Bovino</i>	F6178	Sigma-Aldrich
<i>Medio McCoy's 5A</i>	M8403	Sigma-Aldrich
<i>Solución salina balanceada de Hanks</i>	H8264	Sigma-Aldrich
<i>SDS</i>	L3771	Sigma-Aldrich
<i>DMEM: F-12</i>	30-2006	ATCC
<i>Trypsina 0.25%- 1 mM EDTA</i>	25200-056	Gibco
Softwares:	Motic Images Plus 2.0 y Oligo 6	

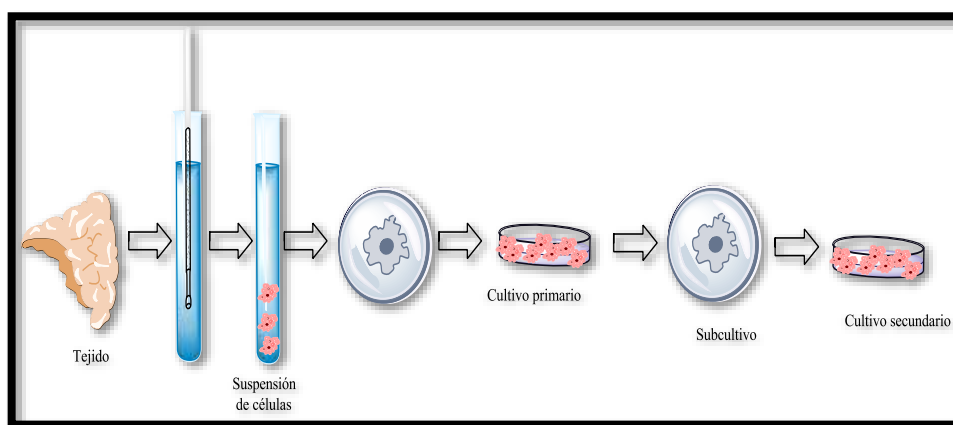
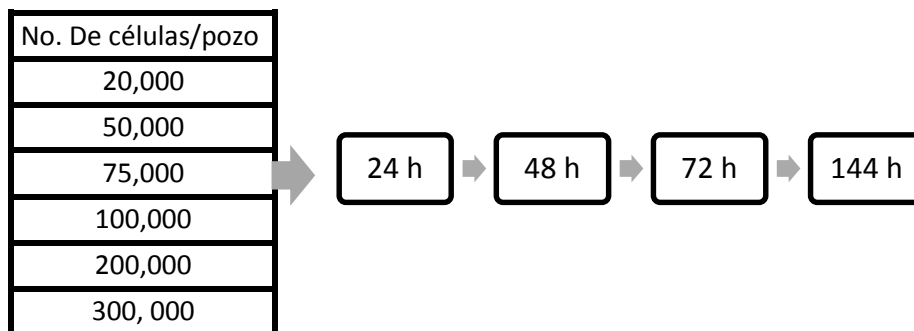


Figura A3. Esquema de cultivo celular.

ENSAYO PRELIMINAR

Inicialmente se realizó un ensayo preliminar para establecer el número de células a sembrar por pozo, para ello se decidió sembrar los distintos números de células que se indican en la Tabla A5 y se procedió a observar la confluencia a diferentes intervalos de tiempo.

Tabla A5. Diseño experimental.



Para realizar el cultivo de las células en las placas de 96 pozos, se realizó el conteo de las células en la suspensión celular obtenida con azul tripán en cámara de Neubauer. En el ensayo preliminar se obtuvo una concentración celular de 1,520,000 células/mL, con lo cual se procedió al cultivo de las células a las diferentes concentraciones y se observó confluencia a distintos tiempos en placas de 96 pozos.

Los resultados de confluencia se presentan de manera gráfica en la Figura A4, donde es posible apreciar que para una concentración de 300,000 células/pozo, a las 48 h se encuentra saturado el crecimiento celular por lo que dicha concentración fue descartada. Para concentraciones de 200,000 y 100,000 células/pozo a las 48 h se alcanzan las confluencias del 80 y 60% respectivamente, mientras que las concentraciones inferiores no alcanzan confluencia superior del 30% a las 48 h.

Para poder determinar el tiempo y la concentración óptima para la realización de los ensayos con materiales poliméricos, se relacionan las confluencias a diferentes tiempos para las concentraciones de 200,000, 100,000 y 75,000 células/pozo; en la Figura A5 puede apreciarse más claramente la confluencia de las células con respecto al tiempo. Basándose en las Figuras A4-A6 se determinó trabajar con cultivos de 100,000 células/pozo a 24 h, para los ensayos de adhesión y 48 h para los ensayos de MTT debido a que estos periodos de incubación permiten el crecimiento celular sin llegar a la saturación para la realización de los ensayos.

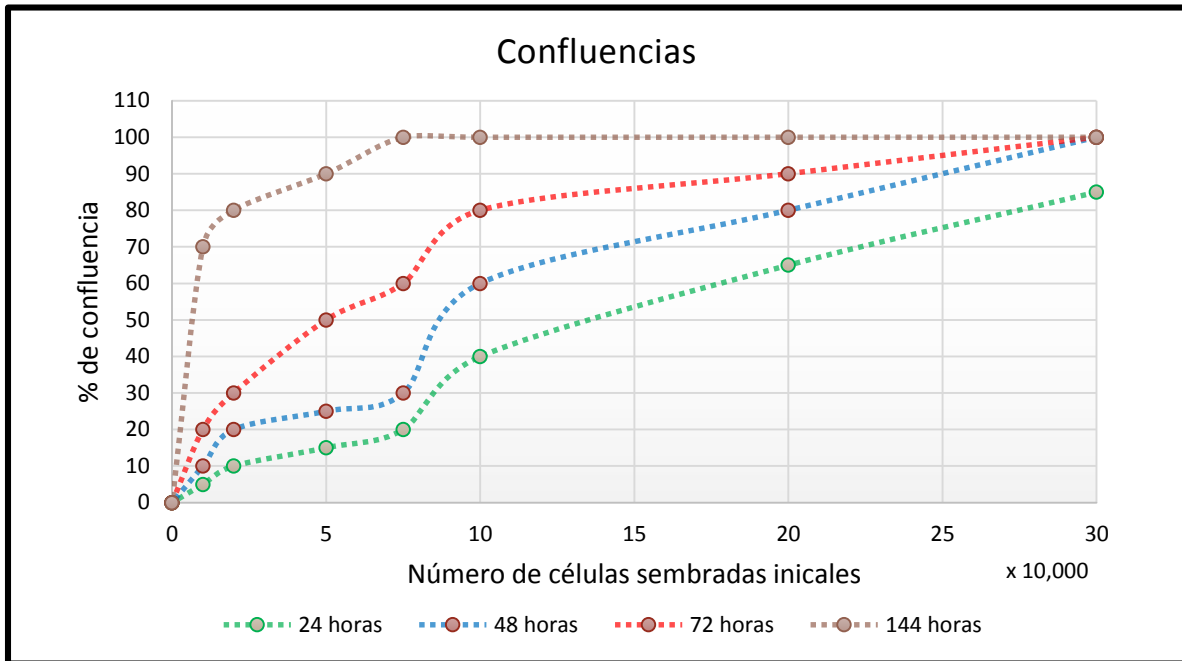


Figura A4. Confluencia de las células HT-29.

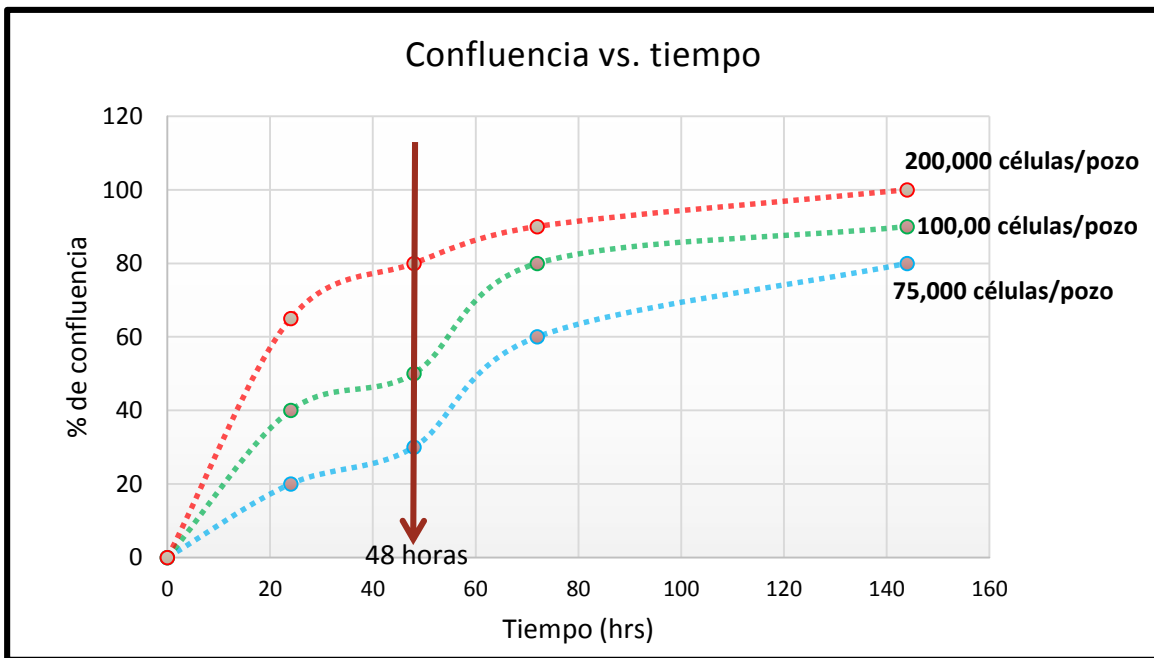


Figura A5. Confluencia vs. tiempo de incubación de las células HT-29 a diferentes concentraciones.

En la Figura A6 se observan los cultivos de 100,000 células por pozo a 24 h con una confluencia del 40%, a 48 h con una confluencia del 60%, a 72 h con una confluencia de 80% y finalmente a 144 h con un crecimiento modificado y saturado a 100%.

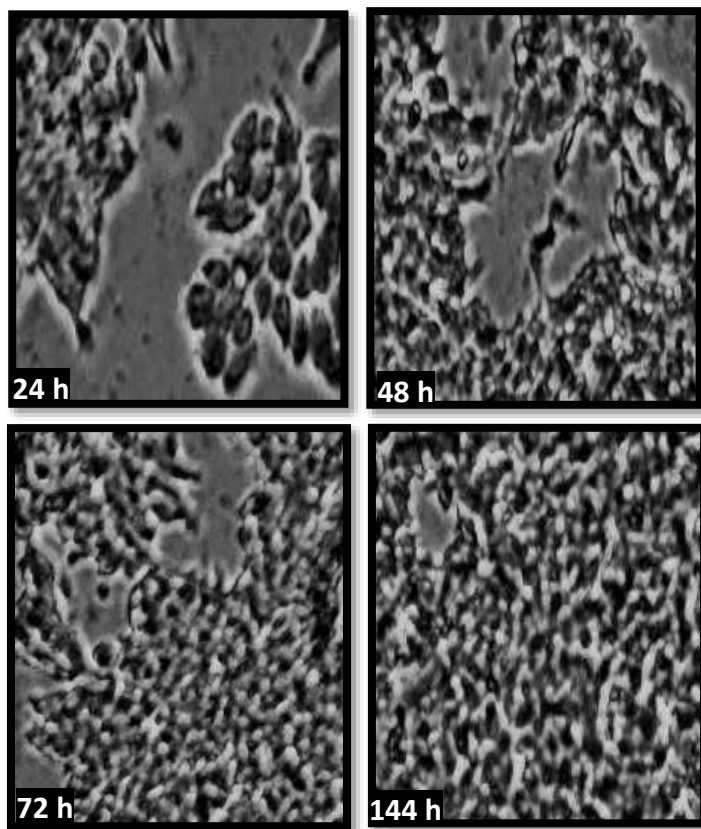


Figura A6. Confluencia de las células HT-29 observadas a distintos tiempos, número inicial de células sembradas 100,000; imágenes obtenidas mediante el software Motic Images Plus 2.0.

Para la realización de este ensayo se empleó el kit MTT (Sigma®), el cual está diseñado para determinar espectrofotométricamente el número de células en función a la actividad mitocondrial de células vivas y con ello estimar la viabilidad. En la prueba MTT, el compuesto Bromuro de 3-(4, 5-dimetildiazol-2-il)-2,5difenil tetrazolio es reducido por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en formazán, que es un compuesto de color azul e insoluble en soluciones acuosas; siendo la cantidad de formazán directamente proporcional al número de células viables.

Partiendo de una solución madre (5 mg/ml) adicionada al 10% del volumen inicial del cultivo, posteriormente, se disuelve el formazán en isopropanol, adicionado en proporción 1:1. Las pruebas realizadas en placas de pocillos múltiples fueron leídas en espectrofotómetro.

En principio, el reactivo MTT se descongeló y fue adicionado en cada pozo de la caja de cultivo previamente preparada con el material (Figura A7).

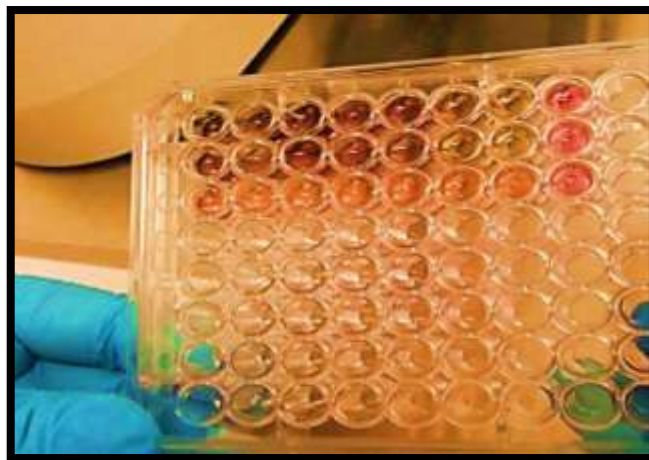


Figura A7. Fotografía de la caja de 96 pozos después del ensayo MTT de células HT-29.

En la Figura A8 se muestran las fotografías de las células antes y después al ensayo MTT, observándose en la Figura A7a la confluencia de los cultivos al 60% para una concentración de 100,000 células/pozo. En la Figura A8b se observan las células en tonalidades azules y aglomeradas después del ensayo MTT indicando la reducción de la sal de tetrazolio al correspondiente formazán.

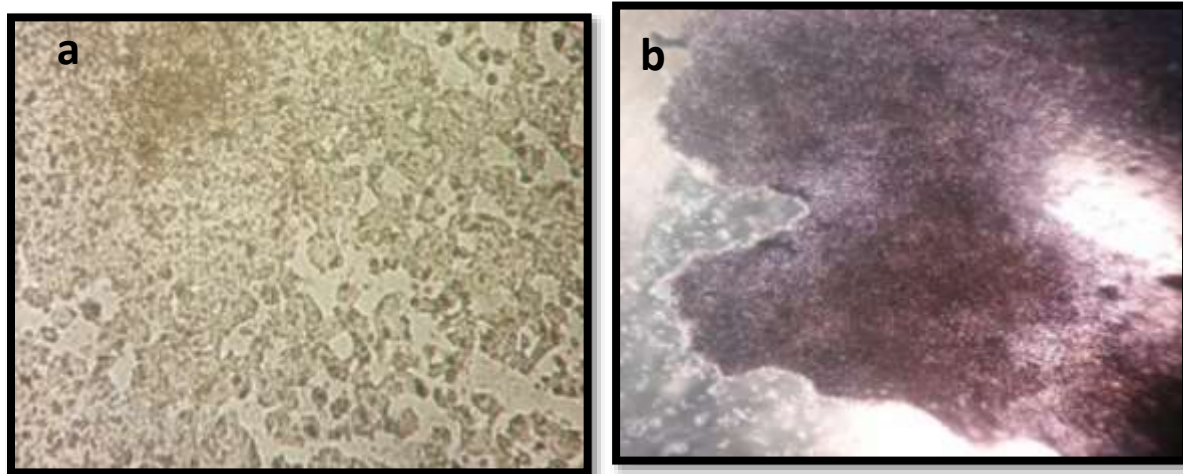


Figura A8. Fotografías de las células HT-29 a) antes y b) después del ensayo MTT.

Posterior al periodo de tratamiento de 3 horas con el reactivo MTT, se mide la densidad óptica en un espectrofotómetro xMark BioRad a 570 nm. En la Tabla A6 se muestran los

resultados del ensayo preliminar MTT para cada concentración celular manejada, el cual se realizó a las 48 horas, mientras que en la Figura A9 se presentan de manera gráfica.

Tabla A6. Resultado de las lecturas de densidad óptica posterior al ensayo MTT.

No. Células	Densidad óptica promedio
300,000	0.66
200,000	0.57
100,000	0.4
75,000	0.39
50,000	0.31
20,000	0.01
10,000	0

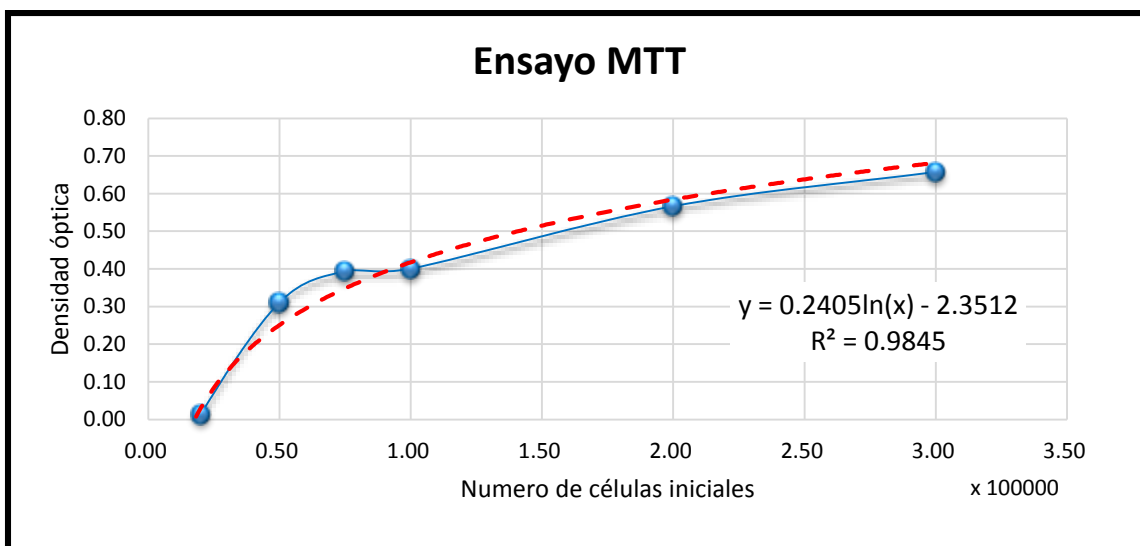


Figura A9. Resultados del ensayo preliminar MTT.

A partir del análisis de la gráfica se obtuvo la ecuación logarítmica siguiente:

$$y = 0.2405 \ln(x) - 2.3512 \quad (A1)$$

Donde y representa la densidad óptica y x la concentración celular, despejando x de la ecuación obtenemos:

$$\ln(x) = \frac{y+2.3512}{0.24051} \quad \text{Por lo tanto, Ecuación 3. } x = e^{\left(\frac{y+2.3512}{0.24051}\right)}$$

(A2)

De los resultados de este ensayo se obtuvieron las condiciones experimentales para los protocolos que se detallan en la siguiente sección.

PROTOCOLOS DE ANÁLISIS *in vitro*

Protocolo 1: Preparación de los materiales

1. Se cortan 21 discos de los materiales polímero/NPMs de 6 mm de diámetro.
2. Se colocan los discos en 10 mL de solución al 5 % p/v de NaHCO₃ y se agita en parrilla magnética a temperatura ambiente y velocidad constante de 3 rpm.
3. Se realizan 4 lavados con 20 mL de agua destilada cada uno de ellos.
4. Se verifica el pH de los lavados con tiras reactivas.
5. Se colocan los discos en cajas Petri de 60x15 mm y se secan a temperatura ambiente por 36 h.
6. Se transfieren a frascos herméticos de vidrio para la esterilización.
7. Se esterilizan los materiales mediante exposición a radiación UV durante 20 min.
8. Se mantienen sellados hasta su uso.

Protocolo 2: Conteo de células en cámara Neubauer y cultivo primario

1. A los cultivos iniciales incubados en botellas matraz T-25 se les retira el medio de crecimiento.
2. Se realizan tres lavados con 5 mL de DMEM: F-12 cada uno.
3. El proceso de tripsinación se realiza adicionando entre 2 y 3 mL de solución de Tripsina 0.25%-EDTA 1 mM, una vez tapada la botella de cultivo se lleva a incubación por 5 min a 37°C y en atmósfera de 5% de CO₂.
4. Se agita la botella suavemente durante 20 s en vórtex y se vierte el contenido a frascos Corning para centrifuga.
5. Se centrifuga durante 6 min a 1,200 rpm con el correspondiente contrapeso.
6. Se desecha el sobrenadante.
7. A las células sedimentadas se le adiciona el medio de crecimiento completo y se homogeniza en vórtex por 30 s.

8. Se extraen 100 μL de la suspensión de células con micropipeta y se agrega un volumen igual de azul tripán al 0.4 % p/v preparado en PBS.
9. Se prepara la cámara de Neubauer colocando el portaobjetos sobre la cámara y se adiciona una gota de la mezcla de suspensión de células/azul tripán en cada uno de los extremos de la cámara.
10. Se realiza el conteo de células por cuadrante en microscopio invertido y con el promedio del conteo obtenido se calcula el número de células/mL.

Cálculos:

$$\text{promedio de células} = \frac{\# \text{ de células contadas}}{4} \qquad \text{células/mL} = \frac{\text{promedio de células contadas}}{1 \times 10^4}$$

$$\text{Volúmen de suspensión} \frac{\text{celular}}{\text{pozo}} = \frac{\# \text{ de células requeridas por pozo}}{\# \text{ de células contadas / mL}}$$

11. Se adiciona con micropipeta en cada pozo, el volumen de la suspensión de células correspondiente al número de células requerido para el análisis correspondiente.

Protocolo 3: Ensayo de Adhesión con Azul de Toluidina

El experimento se realiza por triplicado con:

Control positivo: medio de crecimiento completo y células

Control negativo: medio de crecimiento completo

Control interno: medio de crecimiento completo, células y material

Control interno 2: medio de crecimiento completo, células y material en medias lunas.

1. Se preparan placas de 96 pozos con los materiales correspondientes a analizar, previamente esterilizados.
2. Se adiciona en cada pozo el volumen necesario de la suspensión de células para el cultivo de 100,000 células/pozo siguiendo el protocolo 2.
3. Se incuba la placa a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5% por 24 h.
4. Se observa la confluencia al microscopio, la confluencia sobre el material será $\approx 60\%$.
5. Se realizan 4 lavados con 200 μL de DMEM.
6. Se fijan las células con 100 μL de metanol frío por 20 min.
7. Se extrae y desecha el metanol.
8. Se adicionan 100 μL de solución de azul de toluidina (0.4 % p/v en PBS).
9. Se incuba a temperatura ambiente por 30 min.
10. Se realizan 7 lavados con 200 μL de agua destilada cada uno.
11. Se mide la absorbancia en lector de microplacas a 600 nm.

12. A partir de los resultados se realizan los cálculos estadísticos.

Protocolo 4: Ensayo de Adhesión con Cristal Violeta

El experimento se realiza por triplicado con:

Control positivo: medio de crecimiento completo y células

Control negativo: medio de crecimiento completo

Control interno: medio de crecimiento completo, células y material

Control interno 2: medio de crecimiento completo, células y material en medias lunas.

1. Se preparan placas de 96 pozos con los materiales correspondientes a analizar, previamente esterilizados.
2. Se adiciona en cada pozo el volumen necesario de la suspensión de células para el cultivo de 100,000 células/pozo siguiendo el protocolo 2.
3. Se incuba la placa a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5% por 24 h.
4. Se observa confluencia al microscopio, la confluencia sobre el material será ≈60%.
5. Se realizan 3 lavados con 200 µL de DMEM.
6. Se fijan las células con 100 µL de metanol frío por 20 min.
7. Se extrae y desecha el metanol.
8. Se adicionan 50 µL de solución de cristal violeta (0.1 % p/v en solución acuosa al 20 % v/v de metanol).
9. Se incuba a temperatura ambiente por 20 min.
10. Se realizan 3 lavados con 200 µL de agua destilada cada uno.
11. Se mide la absorbancia en lector de microplacas a 650 nm.
12. A partir de los resultados se realizan los cálculos estadísticos.

Protocolo 5: Ensayo de citotoxicidad por MTT

EL experimento se realiza por triplicado con:

Control positivo: medio de crecimiento completo y células

Control negativo: medio de crecimiento completo

Control interno: medio de crecimiento completo, células y material

1. Se preparan placas de 96 pozos con los materiales correspondientes a analizar, previamente esterilizados.
2. Se adiciona en cada pozo el volumen necesario de la suspensión de células para el cultivo de 100,000 células/pozo siguiendo el protocolo 2.
3. Se incuba la placa a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5% por 48 h.
4. Se observa confluencia en microscopio invertido.
5. Se adiciona a cada pozo el reactivo del kit MTT en volumen igual al 10% respecto al volumen inicial (Volumen inicial= 100 µL por tanto Volumen de reactivo MTT= 10 µL).
6. Se incuba durante 2 h a condiciones estándar (37°C y CO₂ 5%).

7. Se extrae el sobrenadante de cada pozo con micropipeta y se reemplaza por un volumen equivalente del solvente de MTT (frio).
8. Se incuba durante 1 h a condiciones estándar.
9. Se lee la densidad óptica en lector de microplacas a 560 nm.
10. Se calcula el porcentaje de viabilidad a partir de la siguiente ecuación:

$$\% Viabilidad = \frac{\text{Densidad óptica de células tratadas}}{\text{Densidad óptica de células control}} \cdot 100$$

11. Se grafican los resultados en *folios* expresando barras de error.

