



Universidad Autónoma de
Querétaro

Facultad de Ingeniería
Ingeniería en Nanotecnología



Síntesis de materiales nanoestructurados con Cu para sistemas de andamiaje

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA

Presenta:

José Mario Garcidueñas Torres

Dirigido por:

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña

SINODALES

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña

Presidente

Dra. Liliana España Sánchez

Secretario

Dr. Carlos Guzmán Martínez

Vocal

Dra. Martha Eugenia Compeán Jasso

Sinodal

Centro Universitario,

Querétaro, Qro.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Esta tesis se realizo en el laboratorio de materiales nanoestructurados y funcionales en la universidad autónoma de Querétaro campus aeropuerto.

Resumen

Las lesiones en medula hoy en día representan un alto riesgo de mortalidad en la población que padece esta afectación, ya que esta misma puede producir desde espasmo musculares hasta infecciones o trombosis venosas que pueden terminar en la muerte del paciente.

Hoy en día la ingeniería de tejidos es un tema de gran interés a nivel mundial, este se engloba en encontrar tratamientos menos invasivos, con una alta efectividad, sencilla aplicación y principalmente bajo costo. En los últimos años la ingeniería de tejidos ha estado realizando grandes avances a distintos problemas del sector salud por medio de la aplicación de biopolímeros de origen tanto natural como sintéticos usándolos principalmente como sistemas de andamiaje.

En el siguiente trabajo se desarrolló la síntesis de un material compósito a base de quitosano con nanopartículas de cobre, así como diversas caracterizaciones para conocer su estructura y la viabilidad celular, dando resultados favorables para su aplicación como un sistema de andamiaje para su potencial aplicación en la ingeniería de tejidos como un modulador de la reacción inflamatoria y además usarla como alternativa para el tratamiento de lesiones medulares ya que se muestra una alta viabilidad celular y las nanopartículas no generaron cambios en el quitosano.

Agradecimientos

A mis padres

Gracias por todo su apoyo incondicional durante esta etapa tan importante de mi vida, ya que gracias a sus esfuerzos y sacrificios logré ser lo que soy ahora. Gracias a mi padre por ser un gran ejemplo que seguir para mi, y enseñarme a nunca darme por vencido a pesar de las adversidades. Gracias a mi madre por estar siempre para darme un consejo siempre que lo necesite, y darme el cariño y amor en todos los momentos difíciles.

A mis hermanos

Por estar ahí para apoyarme en cada momento difícil, sacarme una sonrisa cada que la necesitara y seguirme en este proceso de mi vida, los quiero mucho y espero que a pesar de las adversidades que se nos presenten, siempre estar unidos.

A mi asesor el Dr. Elizalde

Gracias por todo el apoyo que me brindo tanto como asesor y como amigo durante todo este tiempo.

Dany

Gracias por todo el apoyo y soporte que me has brindado durante estos años, por todos los buenos y malos momentos que nos han ayudado a forjarnos un camino juntos, nos espera un gran futuro por delante juntos. Te amo.

A mis amigos

Por todos mis amigos que siempre me influenciaron a seguir adelante y ser una mejor persona, especialmente a Moroni, que durante mis últimos momentos de la tesis siempre estuvo impulsándome y apoyándome.

A mis compañeros de laboratorio

Por brindarme una cálida estancia durante la investigación por los buenos momentos que pasamos juntos, esperando vernos en las próximas investigaciones.

*“Más vale que digan que lo intentaste y no lo lograste,
a que no lo lograste por que jamás lo intentaste”*

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Dirección General de Bibliotecas UAQ

INDICE GENERAL

I. Introducción	1
II. Antecedentes	2
II.1 Andamios en polímeros	2
II.2 Biomateriales	2
II.3 Ingeniería de tejidos	4
II.4 Biomateriales usados en Ingeniería de Tejidos	4
II.5 Biomateriales poliméricos	5
II.5.1 Biomateriales poliméricos sintéticos	5
II.5.2 Biomateriales poliméricos naturales	6
II.6 Biopolímeros utilizados para andamiaje	7
II.7 Nanotecnología en la ingeniería de tejidos	8
II.8 Quitina y quitosano	9
II.9 Aplicaciones del Quitosano	11
III. Justificación	13
IV. Hipótesis	14
V. Objetivos	14
V.I. Objetivo general	14
V.II. Objetivos específicos	14
VI. Metodología	15
VI.1 Síntesis de la película de quitosano GMA con Np's de cobre y Xantana	15
VI.1.1 Quitosano (Q-g-GMA)	15
VI.1.2 Síntesis de Np's de Cu	16
VI.1.3 Síntesis de películas de quitosano GMA (Q-g-GMA) con Np's de Cu y xantana	16
VI.4 Caracterización de películas de quitosano GMAX con Np's de Cu	17
VI.4.1 Espectroscopia UV-Vis	17
VI.4.2 Espectroscopia IR	17
VI.4.3 SEM	17
VI.4.4 XPS	17
VI.4.5 Prueba de citotoxicidad	18
VII. Resultados y discusión	20
VII.1 Uv-visible	21
VII.2 IR (Espectroscopia infrarrojo)	22
VII.3 SEM (Microscopio electrónico de barrido)	23

VII.4 XPS (Espectrometría de fotoelectrones inducidos por rayos X)	25
VII.5 Pruebas biológicas	31
VIII. Conclusiones.....	33
IX. Perspectivas	33
II. Referencias.....	35

Dirección General de Bibliotecas UAQ

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de la quitina (unidad repetitiva de la quitina) [20].....	9
Figura 2: Unidades repetidas de quitosano: D = d-glucosamina, A = N-acetil-D.glucosamina [22].....	10
Tabla 1: Roles biológicos del quitosano aplicados a tejidos humanos [21].....	11
Figura 3: Reacción para Síntesis de Quitosano GMA (QGMA). [1].....	15
Figura 4: Película de QGMAX con Np's de Cu suspendidas en soya.....	19
Figura 5a: UV-Vis de películas de quitosano GMA y quitosano GMA con xantana y Np's de Cu.....	20
Figura 5b: Ampliación del UV-Vis de quitosano GMA con xantana y Np's de Cu..	21
Figura 6: Espectro IR de quitosano GMA y película de QGMAX con Np's de Cu.	22
Figura 7: Micrografía SEM a), b), c) y d) Película QGMAX con Np's Cu. e) y f) Np's de Cu.....	23
Figura 8a: espectro obtenido por XPS del blanco (Quitosano).....	24
Figura 8b: Espectro general de la película QGMAX con Np's de Cu.....	25
Figura 9: Orbital C1s blanco y muestra de QGMAX con Np's de Cu.....	26
Figura 10: Orbital N1s blanco y muestra de QGMAX con Np's de Cu.....	27
Figura 11: Orbital O1s blanco y muestra de QGMAX con Np's de Cu.....	28
Figura 12: Orbital Cu2p blanco y muestra de QGMAX con Np's de Cu.....	29
Figura 13: Porcentaje de viabilidad celular de película de QGMAX con Np's de Cu Vs. película de QGMA.....	31

Dirección General de Bibliotecas UAQ

I. Introducción

Hoy en día, se hace uso de los materiales poliméricos naturales para la ingeniería de tejidos debido a su gran biocompatibilidad en usos in vivo como pueden ser implantes. Un biomaterial se define como materiales que están diseñados para reemplazar o restaurar algunas funciones naturales de los tejidos u órganos vivos en el cuerpo humano. La ingeniería de tejidos es un área de estudio multidisciplinaria, en la cual se hace uso del conocimiento de varias ramas de la ciencia como pueden ser la biología y la medicina para reparar o reemplazar tejidos dañados. [1-2]

A lo largo del tiempo esta ingeniería ha logrado grandes avances como pueden ser el desarrollo de nuevos biomateriales para aplicaciones biomédicas, como ejemplo se ha estudiado la regeneración de tejido epitelial, medula ósea, medula espinal o incluso en la creación de células madres.

Últimamente se ha puesto gran interés en el quitosano para aplicaciones en ingeniería de tejidos. Ha sido de gran importancia para la cicatrización de heridas, como material para recubrimiento de heridas y quemaduras, agente mucoadhesivo y hemostático, membrana para hemodiálisis y sistema para transporte de sustancias activas. [3]

En este trabajo se plantea la síntesis de una película de quitosano GMA con nanopartículas de cobre para su aplicación como andamio y para sus posibles aplicaciones en la ingeniería de tejidos como agente controlador de inflamación al ser implantada.

II. Antecedentes

II.1 Andamios en polímeros

Los polímeros son moléculas largas, constituidos por pequeños eslabones que se juntan y forman una especie de hilo que se agrupa en miles de millones de hilos más. Los biopolímeros son aquellos que están aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés), de Estados Unidos, para ser aplicados en el cuerpo humano.[4]

Hoy en día existen varias formas para generar andamios, pero la más usada es la que emplea la introducción de un porógeno al biopolímero, mismo que después será extraído. La sal es un porógeno que se compacta en placas, esto se debe a que sus partículas no son homogéneas, al juntarse las unas con las otras dejan huecos entre ellas. El biopolímero se encarga de llenar los huecos existentes y, cuando se introducen en agua, las placas de sal se disuelven y permanecen las estructuras porosas [4].

Otro método se realiza mediante la impresora 3D, en la cual se pueden crear modelos de 200 micras a los que se inyectan el biopolímero que se extrae posteriormente. Otro método es con la liofilización, en la que se produce una disolución del biopolímero en un disolvente que se pone a bajas temperaturas y después se sublima. El biopolímero toma la estructura porosa dependiendo de la velocidad con la que se extraiga el disolvente y de la temperatura a la cual baje [4].

II.2 Biomateriales

Se le considera biomaterial a un material empleado para reproducir la función de tejidos vivos en sistemas biológicos de una forma segura, estos deben ser mecánicamente funcionales y deben ser aceptados fisiológicamente al ser implantados, temporal o permanentemente, en el cuerpo y que el propósito de estos

sea restaurar el defecto existente y, para los materiales utilizados en la ingeniería de tejidos, conseguir la regeneración tisular [5].

Para los biomateriales utilizados en sistemas de andamiaje es fundamental tener un control en el diseño y elección ya que de esto dependerá la funcionalidad de estos, y más si es el caso de utilizarse para la ingeniería de tejidos.

Un biomaterial generalmente debe de ser biocompatible, debe de ayudar a la proliferación celular y además debe de tener las adecuadas propiedades mecánicas dependiendo de su función prospecto. En el caso de los biomateriales que son sintéticos además deben ser estériles y no presentar algún tipo de citotoxicidad en el cuerpo humano [6].

La definición que se ha dado recientemente fue la dada por Jeffrey O. Hollinger [7], el cual define un biomaterial de la siguiente manera: “una sustancia (diferente a un medicamento) o conjunto de sustancias sintéticas o naturales, que pueden ser usados por un período de tiempo como parte de un sistema, el cual trata de curar, mejorar o reemplazar un órgano, un tejido o una función del cuerpo”. Después de acuñar esta definición el “National Institute of Health”, agrega a la definición que los biomateriales deben mejorar o mantener la calidad de vida de los individuos, quedando así la definición oficial de biomaterial [8].

Los biomateriales se han utilizado ampliamente en distintas aplicaciones clínicas tales como, cirugía plástica, oftalmología, neurocirugía, inmunología, histopatología, entre otras más. Recientemente se ha realizado mucha investigación en el uso de biomateriales para la ingeniería de tejidos [6].

II.3 Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos surge como un campo para el tratamiento o la pérdida de tejidos del organismo como pueden ser órganos, músculo o piel entre otros [9]. Esta ciencia tiene como principal objetivo el crear tejidos ya sea biológicos o sintéticos cuya finalidad es mantener o mejorar la función de tejidos y órganos con la ayuda de ingeniería y las ciencias naturales [10].

Esta ingeniería consiste en el diseño, construcción, modificación, crecimiento y mantenimiento de los tejidos, estas pueden ser aplicada por medio de dos vías, los estudios in vitro y los estudios in vivo, la primera involucra la construcción de un tejido artificial con el uso de células donadoras, frecuentemente se utilizan andamios como células que se adhieren, proliferan y se diferencian en tejidos similares o equivalentes. El otro estudio, estudio in vivo también consiste en la construcción del tejido, pero a diferencia del otro este tejido va sobre el ser vivo de estudio [11].

En la ingeniería de tejidos la construcción de andamios es parte esencial de su aplicación. Un andamio es una estructura que provee soporte y que juega un papel importante en el crecimiento de tejidos. Para el desarrollo de andamios se necesitan tomar en cuenta factores, tales como: biodegradabilidad, una apropiada superficie química con favorecimiento al crecimiento celular, proliferación y diferenciación, poros interconectados para la buena integración del tejido y vascularización, así como el no tener efectos adversos como biomaterial.

II.4 Biomateriales usados en Ingeniería de Tejidos

Los principales materiales que se usan en la ingeniería de tejidos son los polímeros naturales como pueden ser el colágeno, la laminina, la fibronectina, la fibrina, el ácido hialurónico, la agarosa, el arginato y el quitosano. La gran parte de ellos se derivan directamente de la matriz extracelular (ECM) de otros tejidos. Estos han sido de gran interés por el uso potencial de sus grandes propiedades, como la posibilidad de unión de ligandos y receptores biológicos, la susceptibilidad a la

degradación proteolítica y remodelación in vivo. Estas macromoléculas naturales pueden ser hidratadas, y sirven como matrices o Scaffolds biodegradables para diversas células in vivo e in vitro [11].

Las principales características de los biomateriales utilizados en ingeniería de tejido neural son: biodegradabilidad, bioactividad neuronal y un módulo mecánico aceptable que le permita acoplarse al tejido neuronal. El objetivo de que el biomaterial se integre al tejido huésped ha llevado al diseño de materiales que pueden promover una respuesta activa, en donde se tienen en cuenta sus propiedades microestructurales, su permeabilidad, las propiedades eléctricas, entre otras. Las principales estrategias son diseñar biomateriales que cumplan con aquellas características y que tengan la ventaja de los procesos de reparación natural para llegar a la proliferación celular y su integración al tejido que se encargara de la rehabilitación o el remplazo [11].

II.5 Biomateriales poliméricos

Los biomateriales se pueden dividir ya sea en sintéticos o en naturales, según sea su origen. Los naturales, como su nombre hacen referencia, se extraen de alguna fuente presente en la naturaleza ya sea de origen animal o vegetal, mientras que los sintéticos son obtenidos por medio de reacciones químicas controladas, siendo el caso de los polímeros su respectivo monómero [12].

II.5.1 Biomateriales poliméricos sintéticos

Los biomateriales sintéticos son los materiales mas versátiles y se han utilizado en una gran variedad de aplicaciones biomédicas como pueden ser: lentes de contacto, vehículos farmacéuticos, material odontológico, sustratos para ingeniería de tejidos, entre otros [12].

Las investigaciones respecto a los biomateriales poliméricos se centran en el desarrollo de materiales biodegradables y/o bioadsorbibles, que logren

descomponerse conforme la regeneración del tejido avance [13]. Los polímeros más comunes para estos casos son los poliacrilatos, polisiloxanos, poliamidas, policarbonatos, poliésteres, poliuretanos, poliestirenos, polipéptidos sintéticos, polialquenos y polioles [12-13].

II.5.2 Biomateriales poliméricos naturales

Estos biomateriales son polimerizados en seres vivos, ya sean de animales, plantas, microorganismos, etc. Para posteriormente aislarlos para su uso. En el caso de los biomateriales naturales se tiene la gran ventaja de que estos tengan una alta biocompatibilidad, buenas reacciones inmunes in vivo, el poder ser funcionalizados y una alta durabilidad. Estos a su vez se pueden dividir en proteínas, poliésteres naturales y polisacáridos [13].

- **Proteínas:** Las proteínas son polímeros naturales los cuales están compuesto de L- α -aminoácidos. Se encuentran aproximadamente 20 aminoácidos de forma natural, los cuales se dividen entre si en 4 niveles distintos según sea su estructura: la estructura primaria se refiere a la secuencia de los aminoácidos presentes, la secundaria se forma por el doblamiento de las cadenas polipéptidas en α hélices o β hojas, la terciaria está formada por el doblamiento de las estructuras secundarias en una estructura tridimensional y por ultimo la cuaternaria está formada por una gran cantidad de subunidades de estructuras terciarias [14].
- **Poliésteres naturales:** Estos están compuestos principalmente por los polihidroxicanoatos (PHAs), producidos por fermentación bacteriana de lípidos o azúcares como reserva de energía. Los PHAs hacen estructuras esféricas en el cuerpo del microorganismo y debido a sus altos costos de producción han tenido un problema de mercado, haciendo que este biopolímero con gran potencial no sea muy utilizado para nuevas aplicaciones biomédicas [15].
- **Polisacáridos:** Estos son carbohidratos constituidos principalmente por azúcares simples los cuales están unidos por enlaces glucosídicos. Para las

aplicaciones biomédicas los más importantes en esta sección son la celulosa, el almidón, el quitosano, el alginato y el ácido hialurónico que poseen en su estructura básica la glucosa [16].

II.6 Biopolímeros utilizados para andamiaje.

Tomando en cuenta que los andamios que se utilizan para el proceso de regeneración de algún tejido deben de ser temporales, es preferente el uso de biomateriales que sean biodegradables sin importar si son de origen natural o sintético.

Para estas aplicaciones el uso de polímeros naturales es el más comúnmente usado, ya que generalmente este es biológicamente similar a la matriz extracelular nativa, por lo cual nos permite la interacción de las células con nuestro biopolímero de modo que nos facilita la adhesión, proliferación y diferenciación celular [17].

En recientes aplicaciones, el colágeno se a utilizado con pequeñas cantidades de otros compuestos, tales como los glicosaminoglicanos, los cuales se incorporan para el mejoramiento de las interacciones del andamio ya sea a base de colágeno o quitosano. La gelatina, derivada de la desnaturalización del colágeno, es otro de los polímeros naturales utilizados para la síntesis de andamios.

Debido a que la quitina es insoluble en compuestos orgánicos y, además, es difícil de procesar, Por esto el quitosano que es su derivado, es el que se usa con mayor frecuencia en diferentes aplicaciones [17]. No obstante, una de las principales desventajas de los andamios sintetizados por rutas ecológicas, se ocupa glutaraldehído o genipina como un agente de entrecruzantes para los polímeros antes mencionados.

II.7 Nanotecnología en la ingeniería de tejidos

La nanotecnología hoy en día juega un papel muy importante en la ingeniería de tejidos ya que al ser una ciencia muy joven aún queda mucho por descubrir. Se están haciendo grandes avances tecnológicos en la regeneración de tejidos de todo tipo como pueden ser tejidos musculares, neuronales y epiteliales. [17]

Cada vez es más común que la nanotecnología sea utilizada para la ingeniería de tejidos, ya que se ha descubierto que el uso de nanopartículas metálicas como pueden ser el oro, plata y cobre, pueden ayudar como agentes microbianos, regenerativos o pueden ayudar a la comunicación de reacciones químicas o de estímulos, Por estos motivos se considera que estas nanopartículas tienen características de gran interés para los tejidos. [17]

La nanotecnología junto con la aplicación de materiales nanométricos es considerada como una de las posibles soluciones a las diferentes problemáticas de la medicina regenerativa, una gran cantidad de estudios demuestran la reducción de tiempos de curación con las aplicaciones de nanomateriales, de igual manera, se ha usado para implantes y prevención de invasión bacteriológica causantes de infección múltiple. [18]

En los últimos 15 años, los nanomateriales han tenido un gran impacto ya que estos han resaltado como alternativas o mejoras a la ingeniería de tejidos, esto se debe a que tienen mejor citocompatibilidad mejora en las propiedades mecánicas, eléctricas, ópticas, catalíticas y magnéticas, en comparación con los materiales microestructurados. [19]

II.8 Quitina y quitosano

La quitina es el segundo polisacárido en abundancia en la naturaleza, después de la celulosa. Este fue descubierto por Braconnot en 1811 cuando estudiaba las sustancias derivadas del *Agaricus Volvaceus* y otros hongos. Posteriormente Odier, en un artículo sobre insectos reportó el haber encontrado en alguna especie de la sustancia que forma la estructura de las plantas, llamándola quitina. Ya en 1943, Payen, inició una controversia que duró más de cien años sobre la diferencia entre la quitina y la celulosa, esto por que se pensaba que la presencia de nitrógeno reportada en investigaciones previas se debía a restos de proteínas que no podían ser completamente eliminados de las muestras. [20-21]

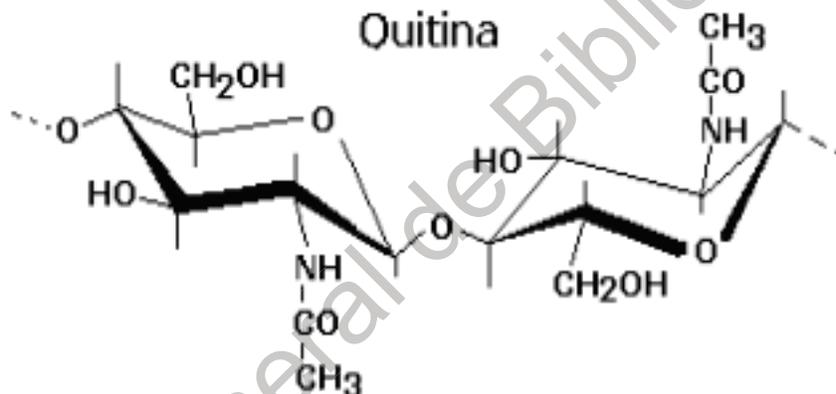


Figura 1: Estructura de la quitina (unidad repetitiva de la quitina) [20]

El nombre sistemático de la quitina es β (1-4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa. La quitina se obtiene principalmente de las conchas de crustáceos y en los exoesqueletos de algunos insectos, en paredes celulares de la mayoría de los hongos, levaduras y algas. La quitina es insoluble en agua y medios ácidos. La estructura de la quitina se puede observar en la figura 1 [20].

Por otro lado, el quitosano también es un polisacárido que se encuentra de igual manera en paredes celulares de algunos hongos, no obstante, es más común

obtenerla por hidrólisis de la quitina en un medio alcalino (Hidróxido de sodio o de potasio) a altas temperaturas. El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859, quien observó que al tratar quitina con una solución de hidróxido de potasio se obtiene un producto soluble en ácidos orgánicos. Este se adquiere un color violeta en soluciones de yoduro y ácido, mientras que la quitina al estar en el mismo proceso era verde. En 1894, Hoppe-Seyler la observó más a detalle y le dio el nombre de quitosano [20].

El quitosano es considerado el único polisacárido catiónico natural, por esto mismo, tiene características únicas para distintas aplicaciones biomédicas. En su estructura, el nitrógeno se encuentra como una amina alifática primaria y origina reacciones muy comunes de ese grupo funcional. De la misma forma que la quitina, el quitosano no se presenta como una molécula única, hay una gran variabilidad no solo en el tamaño de las cadenas, sino también en el grado de desacetilación [21].

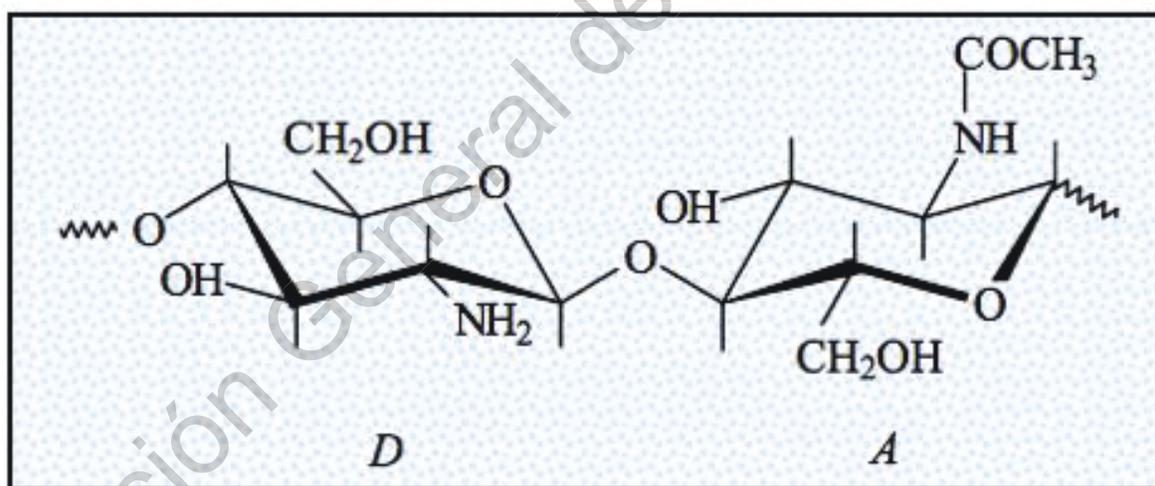


Figura 2: Unidades repetidas de quitosano: D = d-glucosamina, A = N-acetil-D.glucosamina [22].

“En el organismo humano, la N-acetil-D.glucosamina se encuentra unida con el ácido D-glucónico por enlaces alternativos β -1,4 y β -1,3. Estas uniones

conforman la unidad repetitiva del ácido hialurónico, sustancia fundamental del tejido conjuntivo” [21].

II.9 Aplicaciones del Quitosano.

a) Aplicaciones en el área biomédica.

Hoy en día existen una gran variedad de estudios que demuestran que el quitosano puede ser usado para promover el crecimiento celular y la inhibición de la fibroplastia, por esta razón, el quitosano es un polímero de gran interés para el desarrollo de biomateriales [1-22].

Tabla 1: Roles biológicos del quitosano aplicados a tejidos humanos [21]

Propiedades
<p>Ordenar al reconstrucción de tejidos :</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Osteoinducción.▪ Curación de lesiones en meniscos.▪ Curación de úlceras y heridas. <p>Inmunoestimulación.</p> <p>Estimulación de la migración de estromas.</p> <p>Biodegradabilidad enzimática.</p> <p>Mucoadhesión.</p> <p>Actividad antimicrobiana :</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Formación de complejos polielectrolitos.▪ Quelación de metales de metaloenzimas.▪ Inhibición de enzimas ligadas a quitina.▪ Alteración de la adhesión bacteriana. <p>Importancia dietaria :</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Actividad antiolesterolémica.▪ Control de sobrepeso.

Sanford y Steiner, reportan las siguientes propiedades biológicas para el quitosano: hemostáticas, bacteriostáticas, fungistáticos, antitumoral, antiolesterolémica, inmunoadyuvante y sedante del sistema nervioso central [23].

La quitina y el quitosano se usan principalmente en la industria como recubrimientos protectores comestibles y en procesos industriales como espesantes, gelificantes y emulsificantes, como clarificadores en industrias de bebida de tal forma de no afectar el color del producto [23].

c) Aplicaciones en el área agrícola

Unas de las principales propiedades de la quitina y el quitosano que son de utilidad en la agricultura es la actividad antimicrobiana. El uso del quitosano en actividades agrícolas es mucho más reciente, a pesar de ello se puede considerar que su actividad en la agricultura es abundante y en crecimiento. Ya se ha utilizado la quitina y el quitosano en la agricultura como funguicidas, bactericidas, antivirales, inductores de crecimiento y resistencia [23-24].

III. Justificación

La principal causa de discapacidad en la sociedad actual son las lesiones en la médula espinal. Estas lesiones, a parte de afectar la motricidad de quienes las padecen, también generan graves secuelas psicológicas. Entre 250,000 y 500,000 personas sufren cada año en todo el mundo lesiones medulares. Las personas con lesiones medulares son entre dos y cinco veces más propensas a morir prematuramente que las que no los padecen; las tasas de supervivencia más bajas corresponden a los países de ingresos bajos y medios.

Las lesiones medulares se relacionan a distintos padecimientos de enfermedades las cuales no se asocian de manera directa con las lesiones, estas enfermedades pueden resultar debilitantes o incluso pueden llegar a ser de gran riesgo para el paciente, ya que podrían causar incluso la muerte de este. Un ejemplo puede ser trombosis venosas profundas, infecciones urinarias, espasmos musculares, osteoporosis, úlceras de decúbito, dolores crónicos y complicaciones respiratorias [24].

Actualmente hay terapias que tratan a los pacientes para evitar todos esos efectos secundarios e incluso pueden llegar a eliminar parcialmente la discapacidad de los pacientes, pero esto solo es posible con una asistencia tanto medica como psicológica, las cuales son muy prolongada en cuestiones de tiempo y esto conlleva a grandes gastos sin un porcentaje seguro de recuperación. Hoy en día no existe ni un tipo de terapia o tratamiento que evite la pérdida de tejido medular que genera estas lesiones, ni un biomaterial que promueva la regeneración axonal que lleva a una cura totalmente efectiva de la parálisis.

IV. Hipótesis

El polímero Q-g-GMA demostró, por si mismo, tener un buen desempeño dentro de la ingeniería de tejidos, por lo que al introducir un refuerzo nanométrico este deberá mejorar sus propiedades para ser aplicado igual que su antecesor.

V. Objetivos

V.I. Objetivo general

- Desarrollar un biomaterial con propiedades de andamiaje a partir de quitosano y Np's de cobre con el fin de promover la regeneración celular.

V.II. Objetivos específicos

- Desarrollar la metodología experimental para la síntesis de Np's de cobre en películas de quitosano.
- Caracterizar el compuesto por las técnicas de Uv-vis, espectroscopia infrarroja (IR), microscopía electrónica de barrido (SEM) y Espectrometría de fotoelectrones inducidos por rayos X (XPS).
- Determinar si las películas de Np's de cobre con quitosano tiene las propiedades ideales para uso biomédico por medio de pruebas de citotoxicidad.

VI. Metodología

VI.1 Síntesis de la película de quitosano GMA con Np's de cobre y Xantana

VI.1.1 Quitosano (Q-g-GMA).

La síntesis de QGMA (Quitosano glicidil-metacrilato) se realizó según lo reportado por Flores Ramírez y colaboradores en 2005 [27]; se disolvieron 2g de Quitosano en una solución de ácido acético glacial 0.4 M, se adicionó hidróxido de potasio (KOH) al 15% de la reacción y GMA en una relación 1:4. Se hizo reaccionar la mezcla por una hora a 60 ± 2 °C, para posteriormente realizar una precipitación en acetonitrilo a 40 ± 1 °C, con agitación magnética constante.

El producto final, QGMA, es un compuesto fibroso blanco, el cual se conservó lejos de la luz del sol para su posterior aplicación (Figura 3).

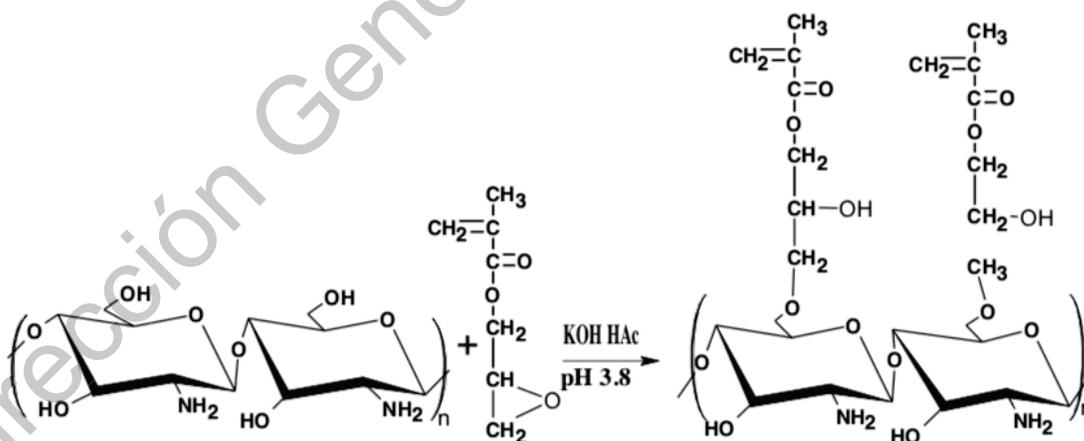


Figura 3: Reacción para Síntesis de Quitosano GMA (QGMA). [1]

VI.1.2 Síntesis de Np's de Cu.

Se hizo una solución de Q-g-GMA en ácido ascórbico al 0.2M la cual se disolvió durante 2 h con agitación a 50°C; Transcurridas las 2 h se le agregaron 80µL de una solución de CuSO₄ al 0.5M, en seguida, se le agregó 80µL de NaBH₄ al 0.1M y se dejó en reposo a 75°C durante media hora.

La Dra. Compean de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) y su grupo de investigación proporcionaron Np's de Cu suspendidas en una solución de soya para estabilizarlas.

VI.1.3 Síntesis de películas de quitosano GMA (Q-g-GMA) con Np's de Cu y xantana.

Se agregó xantana a la solución de Q-g-GMA con las Np's de Cu en relación 1:1 y se deja en agitación por media hora, después se deja secar a temperatura ambiente hasta tener una película delgada.

También se realizó la síntesis de dicha película con las Np's de Cu que nos fueron proporcionadas por la UASLP. Para esta síntesis se procedió disolviendo el Q-g-GMA en ácido acético 0.4 M dejando una solución de QGMA al 1%, por otro lado, se agregó a un vaso de precipitado agua destilada y se hizo una solución al 1% de xantana, ya que estuvo disuelta la xantana se le agregaron 1ml de la solución de Np's de Cu en soya. Pasados 10 min de agitación de la solución se combinaron ambas y se dejó reaccionar 30 min para posteriormente dejar secar a temperatura ambiente hasta tener una película delgada.

VI.4 Caracterización de películas de quitosano GMAX con Np's de Cu.

VI.4.1 Espectroscopia UV-Vis

La espectroscopia UV-Vis se realizó con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35 con un rango de 190 – 1100 nm y con un rango de absorbancia de 3.2A.

VI.4.2 Espectroscopia IR

Los espectros IR se registraron en un espectrómetro Perkin Elmer (modelo Spectrum One), en el rango de 4000 - 400 cm^{-1} a una resolución de 4 cm^{-1} en el modo de transmisión.

VI.4.3 SEM

La caracterización por SEM se realizó en un equipo IntouchScope/JSM-6010LA con una aceleración de voltaje de 500 V to 20 kV y un aumento de 5X a 300,000X.

VI.4.4 XPS

La caracterización por XPS se realizó con un equipo Thermo Scientific™ K-Alpha™ + espectrómetro, con un tipo de fuente Al K alpha, con un tamaño de punto de 400 μm , paso de energía de 20 eV, con un total de 10 escaneos. Todos los espectros adquiridos fueron procesados por el software Advantage y referenciados al enlace C – C a 284.8eV (NIST Standard Reference Database 20, Versión 4.1).

VI.4.5 Prueba de citotoxicidad

Adicional a las pruebas de caracterización que se realizaron se pudo hacer una prueba de citotoxicidad en el Instituto Tecnológico de Monterrey campus Guadalajara donde se uso el protocolo MTT, el cual consiste en los siguientes pasos:

- Cultivo de células

Se extrajeron los tubos criógenos del supercongelador para transferir las células a un tubo Falcón y centrifugar la solución a 1000 rpm por 10 min, posteriormente se retiró el sobrenadante para recuperar el pellet, al cual se agregaron 3 mL de medio suplementado con suero bovino; después de resuspender la solución para separar las cadenas de células formadas (grumos) finalmente se agregaron dentro de un frasco T y se dejaron incubar a 37 °C en oscuro.

- Lavado de membranas y películas

Primero se corto cada una de las películas en pequeños pedazos (alrededor de 0.5 cm x 0.5 cm), posteriormente se procedió a lavar con medio de cultivo y antibiótico al 1% (gentamicina); los lavados se realizan hasta que el medio no cambie de color, es decir que tenga un pH de 7.4.

- Montaje de material en las placas de cultivo

En una placa de 24 pozos se colocaron dos corridas por triplicado de cada material, posteriormente se colocó en luz UV por 10 min (de cada lado de la placa) para asegurar la muerte de bacterias y hongos.

Pasado el tiempo se colocó en cada pozo 100 µl de la suspensión celular obtenida de un Frasco T y 500 µl de medio de cultivo suplementado con suero de

bovino y antibiótico (medio completo) para después dejarlas incubar por el tiempo al que se quiera realizar la medida; para este caso fue de 24, 48 y 120 h.

- Pruebas MTT

De todos los pozos a analizar se retiró el medio completo, para posteriormente agregar 10 μ l de una solución de MTT y 90 μ l de medio de cultivo. Se deja incubar por 4 h a 37 °C en oscuro. Pasado el tiempo se retiró la solución sin retirar o destruir la membrana o película y después se agregaron 100 μ l del solvente de MTT (isopropanol); posteriormente se agitó suavemente para asegurar la salida del MTT de la mitocondria de cada célula o garantizar la disolución de los cristales de Formazan MTT. Finalmente se retira la solución de cada pozo, para después medir la absorbancia espectrofotométrica en un lector de microplacas ELISA (IMark) a una longitud de onda de 595 y 655 nm.

VII. Resultados y discusión

Se realizaron película con ambas NPs, mientras se trabajó con ellas se observó que al tratar de hacerla con nuestras Np's de Cu no se obtenía una película uniforme, además de que el material al que llegábamos se tornaba muy quebradizo por lo cual se optó solo trabajar con las Np's de Cu estabilizadas en soya, ya que con estas se lograba tener una película con mejores propiedades mecánicas (ver figura 4).



Figura 4: Película de QGMAX con Np's de Cu suspendidas en soya.

VII.1 Uv-visible

Se realizó la caracterización en UV-vis de la película de Quitosano GMA con Np's de Cu para estudiar el tamaño de partículas dispersas en la misma. Para este estudio se usó como blanco una película de quitosano GMA, en la Figura 5a y 5b se puede observar el espectro obtenido de la caracterización en el cual se tiene una banda de absorción entre los 800 y 700 nm aproximadamente, esta banda está asociada a la formación del cobre en uno de sus estados de oxidación (Cu_{2+}). Al

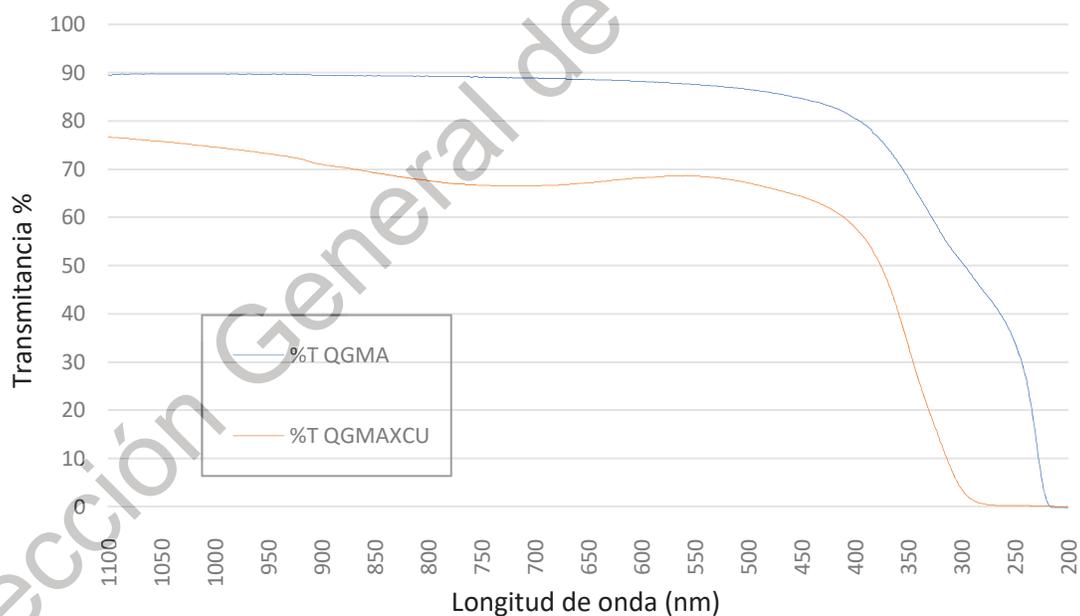


Figura 5a: UV-Vis de películas de quitosano GMA y quitosano GMA con xantana y Np's de Cu

tener esa absorción nos indica que el cobre se esta oxidando con el medio debido a que no se encuentran estables en la película de quitosano [26].

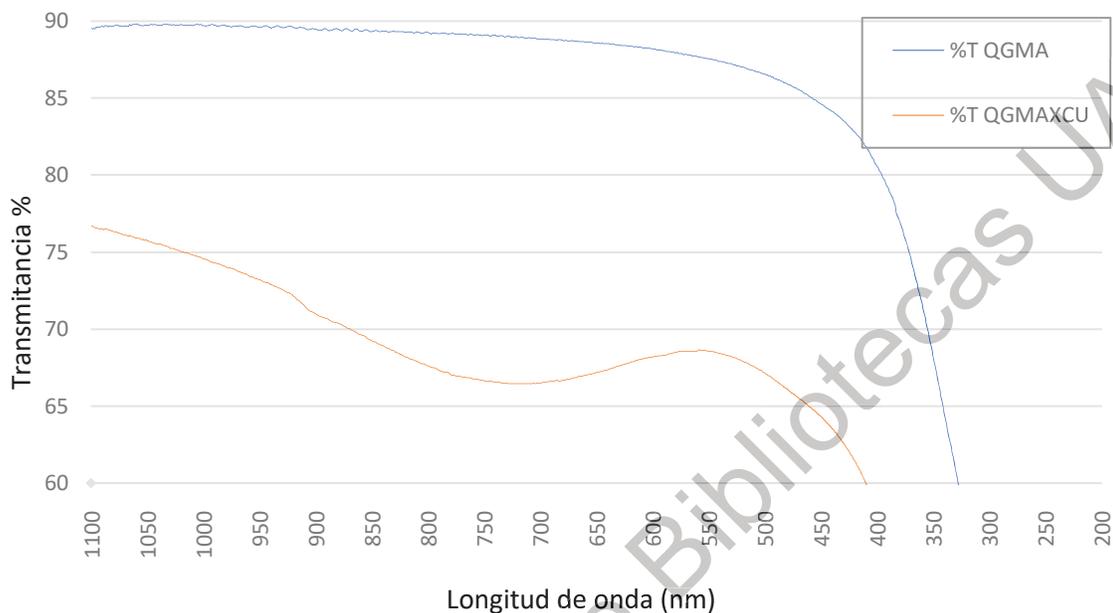


Figura 5b: Ampliación del UV-Vis de quitosano GMA con xantana y Np's de Cu.

VII.2 IR (Espectroscopia infrarrojo).

El espectro infrarrojo se utilizó para estudiar las interacciones del polímero con las NPs, y como podemos ver en la figura 6, se tiene una gran similitud en ambos espectros, lo cual nos indica que nuestras Np's de Cu solo interactúan con el medio de una manera física sin modificar las interacciones químicas que existen entre el quitosano GMA y la xantana, evitando así modificaciones en la estructura del QGMA, lo cual es útil ya que las nanopartículas por sí mismas no tiene

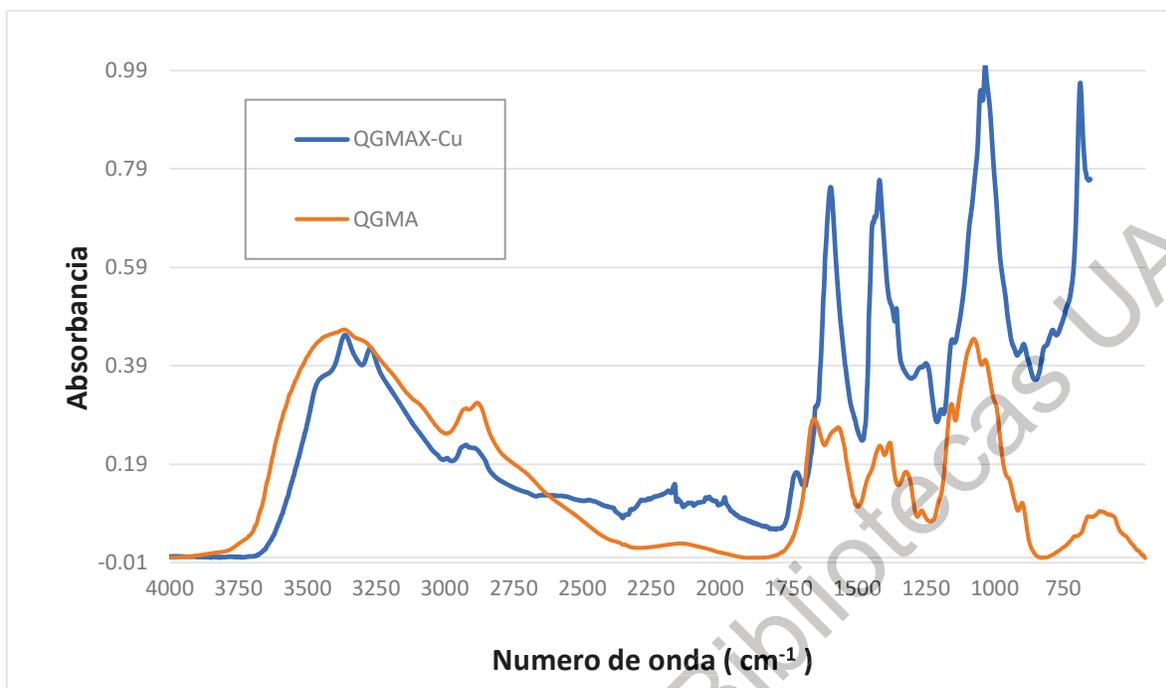


Figura 6: Espectro IR de quitosano GMA y película de QGMAX con Np's de Cu.

VII.3 SEM (Microscopio electrónico de barrido).

Esta técnica se utiliza para conocer su morfología, de esta forma también se sabrá como están distribuidas las Np's de Cu en la película y ver las interacciones física que tiene con el quitosano, para esto se les hizo el análisis con distintos aumentos para localizar una zona con las partículas de interés.

En la figura 7, se muestran imágenes con distintos acercamientos, en la figura 7a podemos observar algunas partículas que no se distinguen bien por que presentan un brillo muy intenso, esto se debe a la conductividad que presentan las partículas, esto nos indicar que se tratar de nuestras nanopartículas ya que al ser metálicas tienen propiedades conductoras. Al observar la imagen se puede ver un arreglo en forma de rombos y no como esferas que es lo que se esperarí en una partícula, esto se debe a dos posibles razones; aglomeramiento de partículas o la

oxidación de estas. En la figura 7b y 7c (acercamientos de 10 y 5 micras) se puede observar más a detalle las partículas conductoras, en esta imagen ya se puede apreciar un núcleo en el centro de la partícula que oscila entre los 1,000 y los 200 nm el cual se puede decir que es nuestra nanopartícula de cobre, pero ya oxidada.

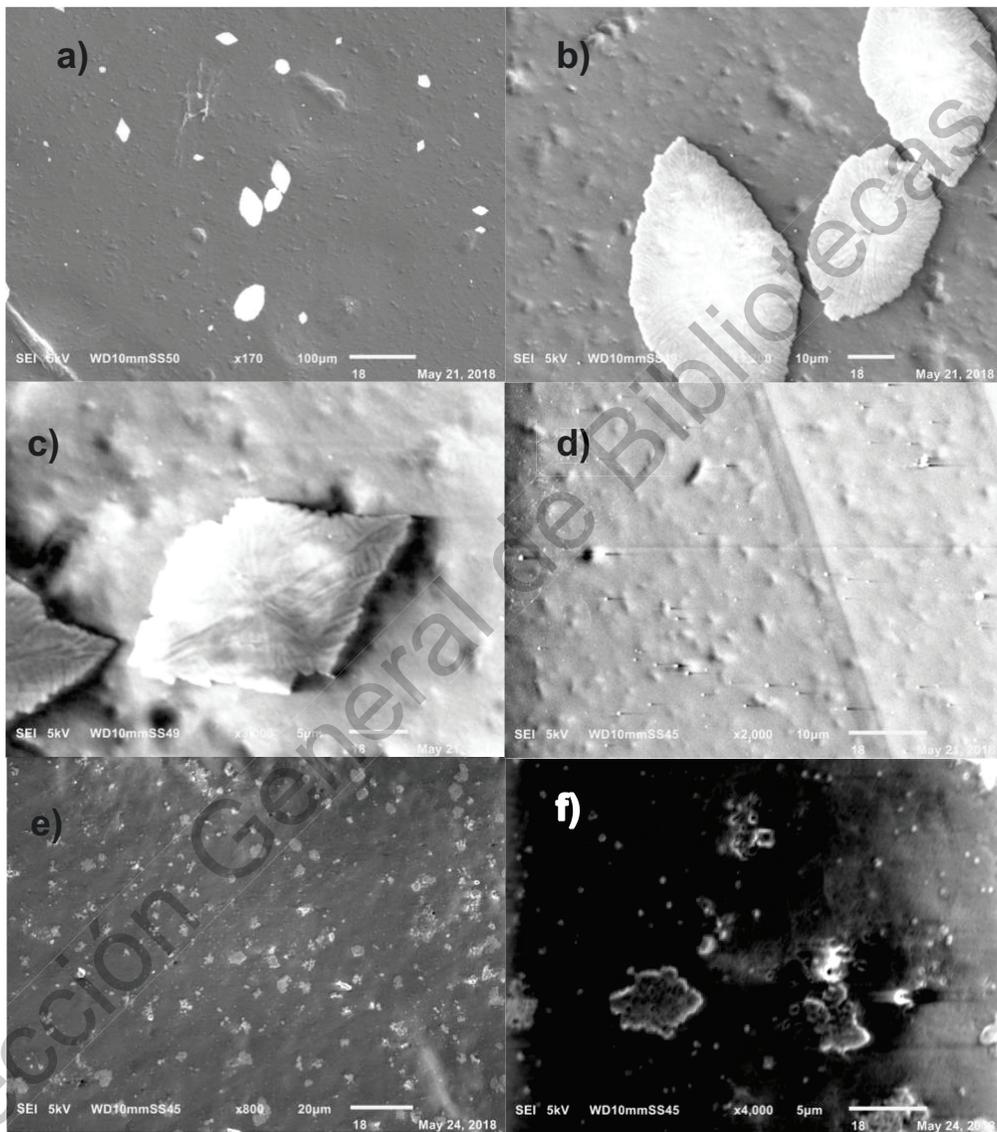


Figura 7: Micrografía SEM a), b), c) y d) Película QGMAX con Np's Cu. e) y f) Np's de Cu

En las cuales se observa aglomeramientos de Np's de Cu, se realizan distintos acercamientos para poder sacar un promedio del tamaño de las Np's que componen dichos aglomeramientos por medio del uso de la escala que nos da el equipo. Se logro hacer un acercamiento de hasta 5 micras con el cual se pueden observar pequeñas partículas solitarias, basándonos en estas, se llega a concluir que se tiene partículas con un promedio de 250 nm de diámetro.

VII.4 XPS (Espectrometría de fotoelectrones inducidos por rayos X).

Para la espectroscopia por XPS se tomo como blanco el QGMA, y como muestra a analizar la película de QGMAX con Np's de Cu. En la figura 8a, se puede observar el espectro del blanco que se utilizó como referencia (Quitosano) para

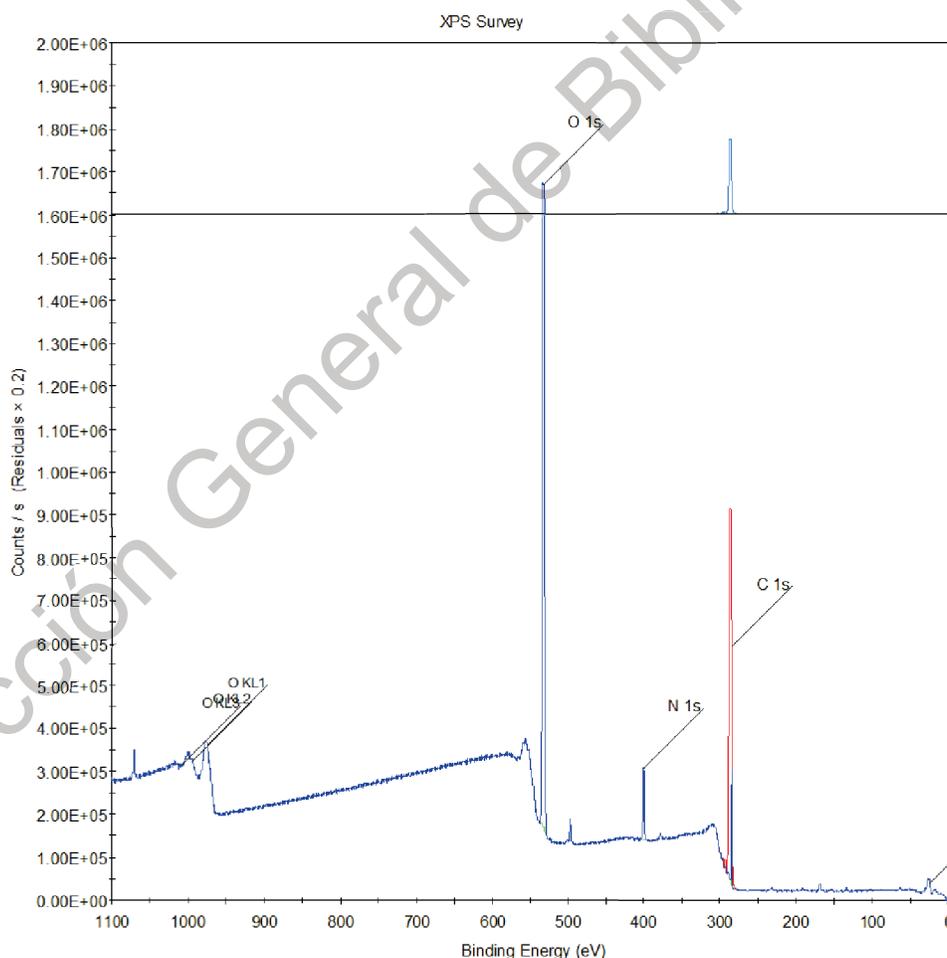


Figura 8a: espectro obtenido por XPS del blanco (Quitosano).

identificar los cambios que obtuvo el quitosano al someterse a las reacciones de Xantana y Np's de Cu.

En la figura 8b se puede observar nuevas bandas que corresponden a los cambios de la película por las reacciones de síntesis que se realizaron con el método descrito. En esta figura también se logra observar una peculiaridad a los 1050 eV ya que se tiene una banda para el Na1s, este se debe a la Xantana

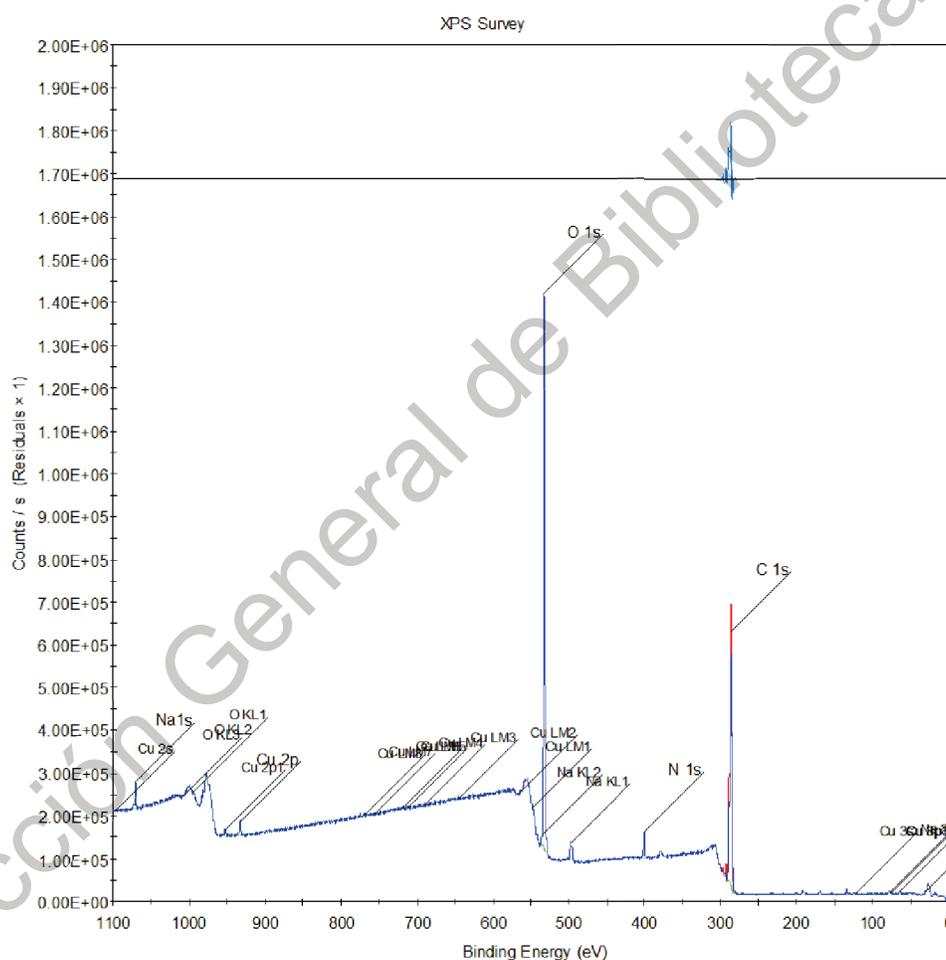


Figura 8b: Espectro general de la película QGMAX con Np's de Cu.

En la figura 9 se le hizo una comparación del orbital C1s para el blanco vs la muestra, se puede observar una banda a los 289 eV el cual corresponde a un

grupo carboxilo, este puede ser gracias al medio ácido en el que el quitosano se disuelve, en este caso, el ácido acético (CH_3COOH).

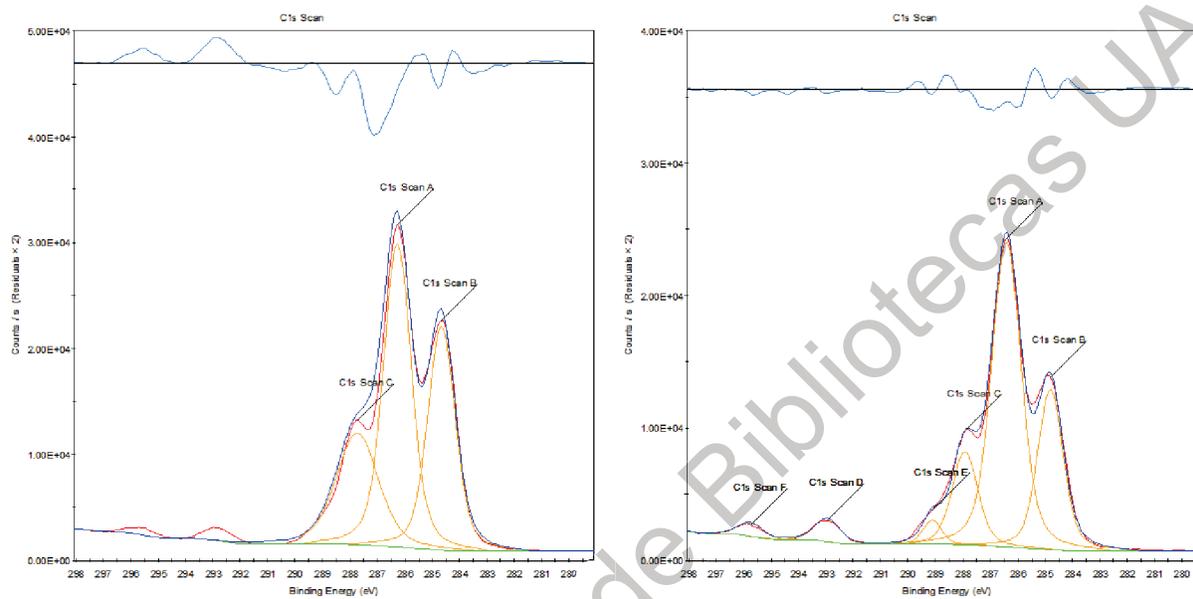


Figura 9: Orbital C1s blanco y muestra de QGMAX con Np's de Cu.

En la figura 10 que es el caso de la presencia de N1s en nuestra muestra, no se ve ningún cambio significativo, ya que nuestro cobre no interacciona con nuestra matriz orgánica, por lo tanto, la banda que se encuentra a los 400 eV, la cual corresponde a esta matriz, no se ve afectada.

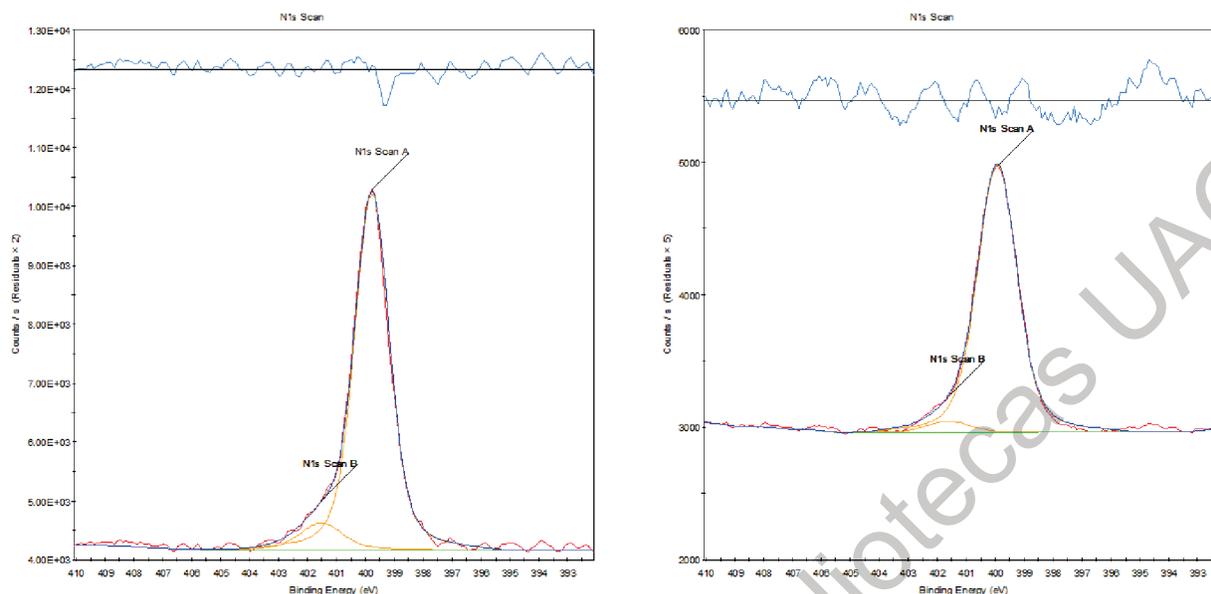


Figura 10: Orbital N1s blanco y muestra de QGMAX con Np's de Cu.

En la figura 11 de igual manera no se ve un cambio muy significativo en la banda, se ve un grande a los 533 eV, esta es por que el oxígeno esta interactuando con los Nitrógenos, ya sean amonios o los nitratos. Por lo que este ensayo nos esta sirviendo para aclara que nuestras Np's de Cu no se están oxidando en la película sintetizada, pero de igual manera podemos intuir que no esta interaccionando el cobre con nuestra película.

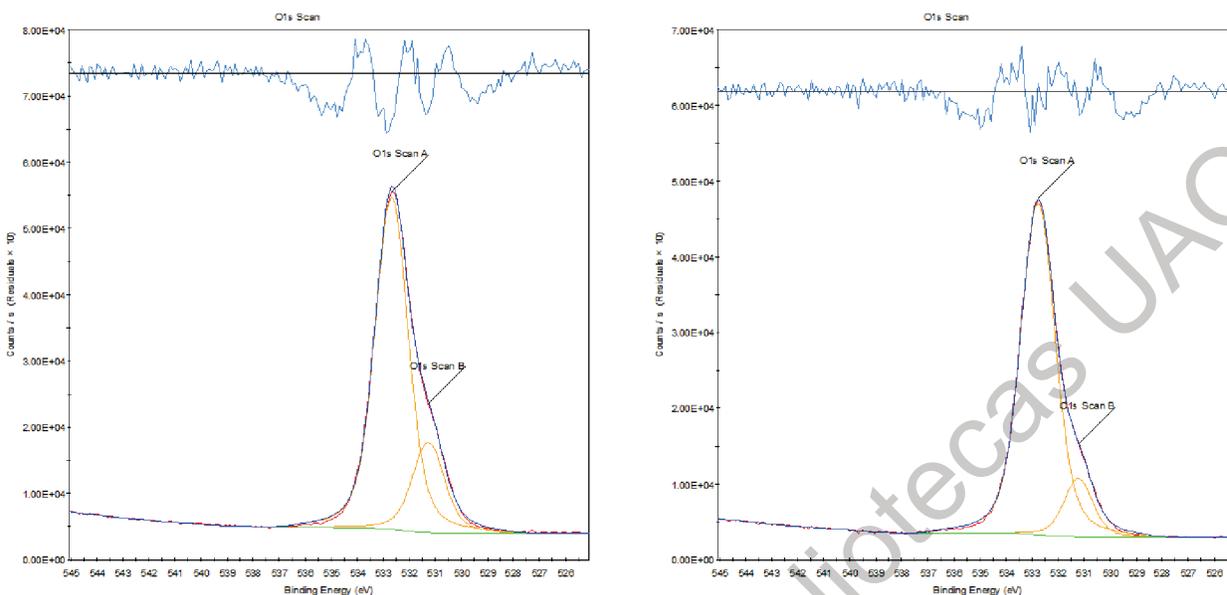


Figura 11: Orbital O1s blanco y muestra de QGMAX con Np's de Cu.

En la figura 12 se muestran los picos de Cu 2p con una amplia gama de picos, desde los picos del satélite a 938 eV hasta el pico de Cu 2p_{1/2} a 952 eV. Esto es en general una confirmación de la presencia de la fase de óxido de cobre (II), indicando que nuestras Np's de Cu se llegan a oxidar al hacer la síntesis de la película, ya que en los estudios realizados por Uv-vis se muestra que las Np's desde un principio no muestran oxidación al estar reducidas.

Con el XPS se identificaron bandas características de las películas de quitosano, además de corroborar que las Np's de Cu solo están interactuando físicamente, por este motivo nuestras Np's de Cu después de un tiempo se empezaban a oxidar a Cu²⁺ en vez de mantener su tamaño nanométrico.

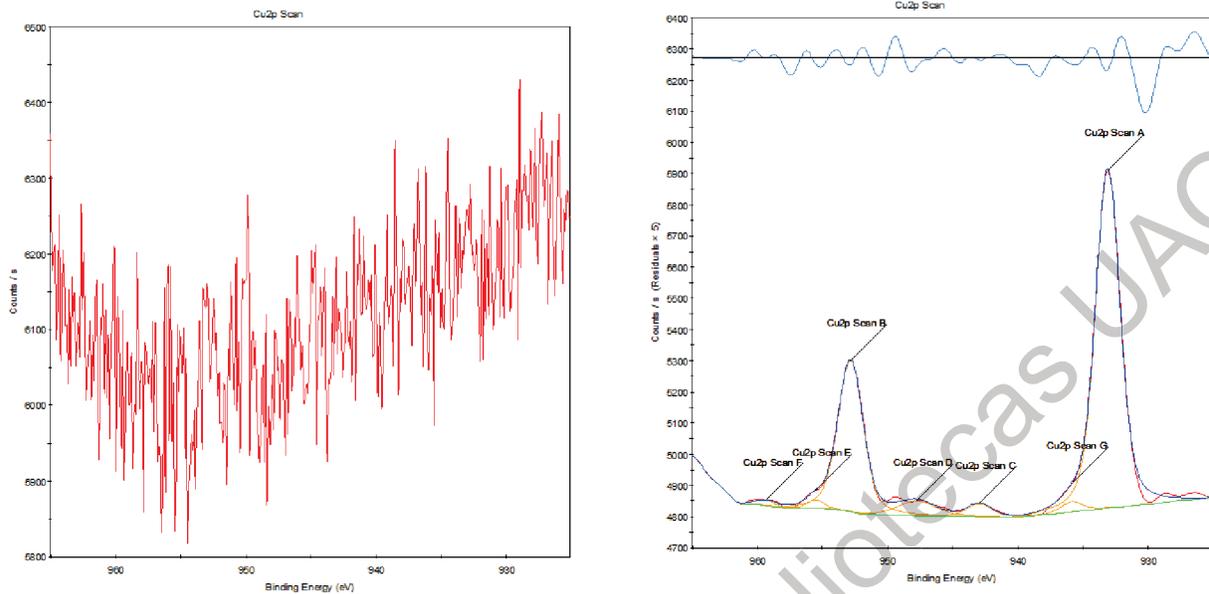


Figura 12: Orbital Cu2p blanco y muestra de QGMAX con Np's de Cu.

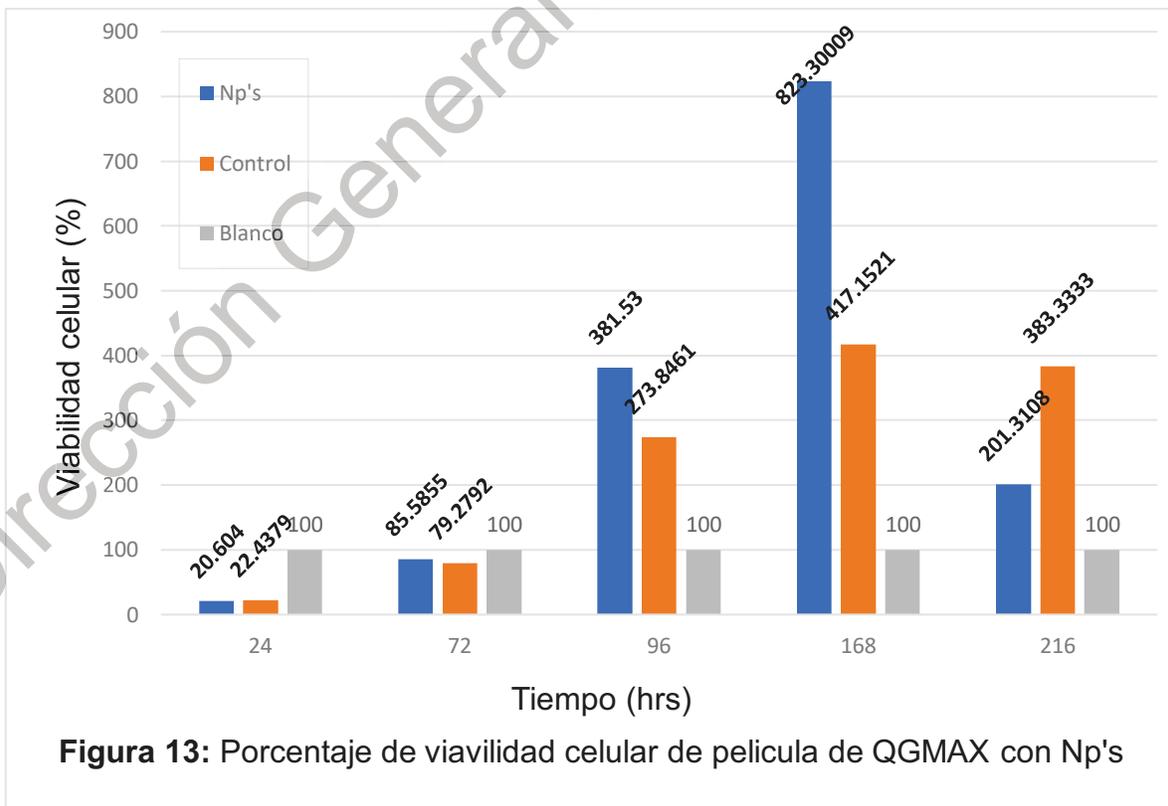


Figura 13: Porcentaje de viabilidad celular de película de QGMAX con Np's

VII.5 Pruebas biológicas

Para estas pruebas se utilizó la línea celular JB de fibroblastos como célula de crecimiento, y se realizaron a distintos intervalos de tiempo para el estudio de la proliferación celular.

Como podemos observar en la figura 13, es un ensayo porcentual de nuestra película de QGMAX con Np's de Cu y se utilizo un control de QGMA, además de que se dejo un blanco de fibroblastos.



Figura 14: imágenes de las placas de crecimiento celular. a) al empezar el ensayo con las enzimas, b) al finalizar el ensayo.

En la grafica se puede observar que la muestra con las Np's de Cu tiene una mejor viabilidad celular que la película sin Cu, lo cual indica que las Np's no solo no son citotóxicas, si no que también el material ayuda a la proliferación. Se observa ya a los 216 que la viabilidad celular baja, esto se debe a que los fibroblastos se encuentran ya en un espacio muy reducido y tomando en cuenta ya todos los

desechos que se encuentran en los pozos, se produce un estrés en los fibroblastos generando su muerte.

Por otra parte, al finalizar las pruebas, se pudo observar que las Np's de Cu migraban de la película hacia los extremos de los pozos (Figura 14), esto podría generar una respuesta benéfica ya que el cobre, que en ciertas cantidades en el cuerpo no genera ni un tipo de reacción adversa, ayuda a la síntesis de mielina, en su síntesis interviene la enzima citocromo C oxidasa, que es una enzima cobre dependiente.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

VIII. Conclusiones

Siguiendo la metodología propuesta en este trabajo se logró sintetizar una película de QGMAX con Np's de Cu estable, a la cual se le hicieron las caracterizaciones pertinentes para el estudio de sus propiedades, tanto químicas como de biocompatibilidad, obteniendo en su mayoría resultados favorables para la investigación.

En cuestión de las propiedades mecánicas que se pudieron observar a simple vista ayudaron a demostrar que el uso de la goma xantana ayuda a mejorar dichas propiedades favoreciendo así a la aplicación de la película como sistema de andamiaje.

Por otra parte, las pruebas citotóxicas arrojaron resultados favorables a cierto punto, ya que al observar la migración de las Np's no se puede definir si puede o no ser perjudicial hasta no realizar pruebas in vivo del material.

Con todo lo anterior se puede concluir que la síntesis de una película de quitosano con Np's de cobre generará el control de la inflamación, encaminado a modular la reacción inflamatoria producida tras una lesión al ser implantadas en la medula espinal de igual forma intentar que las conexiones cerebro-extremidades vuelvan a funcionar después de una lesión en la médula.

IX. Perspectivas

Como trabajo futuro y complementario a esta investigación se debería realizar un estudio tanto in vivo como in vitro muy completo para poder estudiar las reacciones que puede llegar a generar la película dentro de un sistema biológico, así también para poder estudiar su biocompatibilidad.

Como trabajo complementario a este trabajo y con el uso de la metodología descrita, se podrían realizar pruebas con Np's de otro tipo de metales o incluso el variar el

tamaño de partícula para ver el como nos podría afectar en la citotoxicidad del material e incluso incrementar la proliferación celular.

Como aplicación futura se pueden pasar a estudios en animales como el poder realizar laminectomías para estudiar su comportamiento en lesiones medulares y estudiar su efectividad ya aplicado a seres vivos.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

II. Referencias

- [1] Luna-Bárceñas, G., Prokhorov, E., Elizalde-Peña, E., Nuno-Licona, A., Sanchez, I. C., Gough, J. E., ... Schmidt, C. E. (2011). Chitosan-based hydrogels for tissue engineering applications. Nova Science Publishers, Inc.
- [2] José Luís López Lacomba, Viviana Mónica Ramos, ESTUDIO DEL QUITOSANO COMO BIOMATERIAL PORTADOR DE rhBMP-2: DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN Y APLICABILIDAD EN REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO. (2008).
- [3] Vasudev et al., 1997; Chandy y Sharma, 1990 y 1993; Hirano, 1996; Muzarelli, 1993; Patel y Amiji, (1996).
- [4] Marytere Narváez. (2016). De los biomateriales a la ingeniería de tejidos. 18 de octubre del 2017, de CONACYT Sitio web: <http://www.conacytprensa.mx/index.php/tecnologia/materiales/6079-de-los-biomateriales-a-la-ingenieria-de-tejidos-reportaje>.
- [5] Williams DF Biomaterials and biocompatibility. Med Prog Techno (1976).
- [6] Campbell-Walsh, Urología, 9na ed., vol. 1, Madrid: Editorial Medica Panamericana, 2007.
- [7] Hollinge, J.O., An introduction to biomaterials. 2nd Edition. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2012.
- [8] Granados García, O. Arrieta Rodríguez y D. Cantú de León, Oncología y cirugía. Bases y principios., México: Manual Moderno., 2013.
- [9] V. Poonam, V. Verma, P. Ray y R. R. Alok, «Chitosan in Tissue Regeneration, Asian Chitin Journal., Centre for Biomedical Engineering. Indian Institute of technology Delhi, 2007.
- [10] M. Granados García, O. Arrieta Rodríguez y D. Cantú de León, Oncología y cirugía. Bases y principios., México: Manual Moderno. , 2013.
- [11] Kumbar, S.G., Laurencin, C.T. and Deng, M., Natural and synthetic biomedical Polymers. 1st Edition. Burlington: Elsevier Ltd., 2014.

- [12] Marlon Andrés Osorio-Delgado, Leydi Johanna Henao-Tamayo, Jorge Andrés Velásquez-Cock, Ana Isabel Cañas-Gutierrez, Luz Marina Restrepo-Múnera, Piedad Felisinda Gañán-Rojo, Robín Octavio ZuluagaGallego, Isabel Cristina Ortiz-Trujillo, Cristina Isabel Castro-Herazo, Biomedical applications of polymeric biomaterials (2017).
- [13] Guelcher, S.A. and Hollinger, J.O., An introduction to biomaterials. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2006.
- [14] Bonartsev, A.P., Myshkina, V.L., Nikolaeva, D.A., et al., Biosynthesis, biodegradation, and application of poly (3-hydroxybutyrate) and its copolymers - natural polyesters produced by diazotrophic bacteria, (2007).
- [15] McMurry, J., Quimica Organica. 6th ed. Mexico: Thomson, 2004.
- [16] M. Gomes, H Azevedo, P. Malafaya, S. Silva, J. Olivera, G. Silva, R. Sousa, J. Mano, R reis, Chapter 6: Natural Polymers in tissue engineering application. Tissues engineering, Academic Press, Burlington, (2008).
- [17] Shevach, M., Maoz, B. M., Feiner, R., Shapira, A., & Dvir, T. (2013). Nanoengineering gold particle composite fibers for cardiac tissue engineering. Journal of Materials Chemistry B, 1(39), 5210.
- [18] Anusavice, K., Shen, C. and Rawls, H.R., Dental Ceramics. In: Bergmann, C.P. and Stumpf, A., (eds). Phillips' Science of Dental Materials. Berlin: Springer.
- [19] Z. Lijie y W. J. Thomas, Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration, ELSEVIER, vol. 4, (2008).
- [20] John Jaiber González Murillo, Ingeniería de Tejidos aplicada a la Regeneración Neuronal y Nerviosa, (2014).
- [21] Cristóbal Lárez Velásquez, ALGUNOS USOS DEL QUITOSANO EN SISTEMAS ACUOSOS (2003).
- [22] H. Hernández Cocolletzi, E. Águila Almanza, O. Flores Agustin, E.L. Viveros Nava, E. Ramos Cassellis, Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón, (2009).

- [23] Erick Victor Espinoza Espíritu, Propiedades físicas y biológicas de dos tipos de esponjas de quitosano, para su aplicación como biomaterial, (2007).
- [24] Cristóbal Lárez Velásquez, Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica, (2008).
- [25] Guriérrez Cano, Vanessa. (2015). Propiedades Ópticas de Vidrios de Alta Transmitancia Impurificados con Cobre: Estados de Oxidación y Procesos Redox. 10.13140/RG.2.1.1970.6086.
- [26] Zulay Mármol, Gisela Páez, Marisela Ricón, Karelen Araujo, Caterina Aiello, Cintia Chandler, Edixon Gutiérrez, Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones, (2011).
- [27] N. FLORES-RAMÍREZ, E. A. ELIZALDE-PEÑA, S. R. VÁSQUEZ-GARCÍA, J. GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, A. MARTINEZ-RUVALCABA, I. C. SANCHEZ, G. LUNA-BÁRCENAS¹ y R. B. GUPTA⁶, Characterization and degradation of functionalized chitosan with glycidyl methacrylate, J. Biomater Sci. Polymer, vol. 16, no 4, (2005).