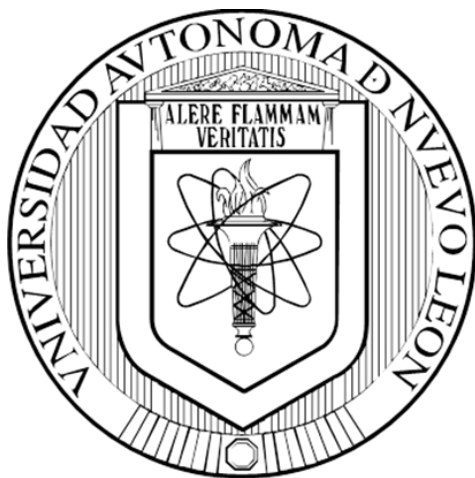


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**“EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN POR LUMINISCENCIA DE
UN COMPÓSITO (FIBROÍNA DE SEDA/HIDROXIAPATITA)
MEDIANTE EL USO DE COMPUESTOS DE BORO”**

POR

M. C. ARELI ABIGAIL MOLINA PAREDES

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA DE
LOS MATERIALES**

MAYO, 2019

**“EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN POR LUMINISCENCIA DE UN
COMPÓSITO (FIBROÍNA DE SEDA/HIDROXIAPATITA) MEDIANTE EL USO
DE COMPUESTOS DE BORO”**

Aprobación de la Tesis:

Dra. Blanca M. Muñoz Flores
Presidente

Dra. Perla Elizondo Martínez
Secretario

Dra. Nora Aleyda García Gómez
Vocal

Dr. Luis Ángel Garza Rodríguez
Vocal

Dra. Bárbara Bermúdez Reyes
Vocal

**“EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN POR LUMINISCENCIA DE UN
COMPÓSITO (FIBROÍNA DE SEDA/HIDROXIAPATITA) MEDIANTE EL USO
DE COMPUESTOS DE BORO”**

Revisión de la Tesis:

Dra. Blanca M. Muñoz Flores
Directora de Tesis

Dra. Perla Elizondo Martínez
Comité de Tesis

Dra. Nora Aleyda García Gómez
Comité de Tesis

Dr. Rodrigo Alonso Chan Navarro
Comité de Tesis

Dra. Ma. Aracely Hernández Ramírez
Sub-Directora de Posgrado

RESUMEN

Areli Abigail Molina Paredes

Fecha de graduación: Mayo 2019

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: Evaluación de la degradación por luminiscencia de un compósito (fibroína de seda/hidroxiapatita) mediante el uso de compuestos de boro.

Número de páginas: 82

Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias con Orientación en Química de los Materiales.

Área de estudio: Química de los Materiales

Propósito y Método de estudio: Gracias a las excelentes propiedades de la fibroína de seda como biomaterial (biocompatibilidad, biodegradación, propiedades mecánicas y maleabilidad) y sus diferentes aplicaciones médicas se ha buscado la mejora de las funcionalidades de los biomateriales mediante la integración de diversos materiales como es un hidroxiapatita y compuestos luminiscentes. Sin embargo, los materiales usados hasta el momento son por métodos de síntesis en multipasos y en condiciones inertes, teniendo como resultado compuestos costosos; además de la importancia de ser materiales no citotóxicos. Es por ello por lo que en el presente trabajo se reporta la síntesis, caracterización espectrométrica, espectroscópica, propiedades fotofísicas y evaluación de la citotoxicidad de tres nuevos compuestos de boro para ser utilizados en un compósito de fibroína de seda e hidroxiapatita.

Conclusiones y contribuciones: En el presente trabajo, se reporta la síntesis de 3 nuevos compuestos de boro derivados de bases de Schiff, mediante un método de síntesis verde (síntesis por microondas), los cuales presentaron mejores resultados en comparación al método de síntesis tradicional de hasta 96 veces menos en el tiempo de reacción; así como la mejora de los rendimientos químicos. Los compuestos fueron caracterizados por diferentes técnicas (RMN ^1H , ^{13}C , ^{11}B , EMAR, UV-Vis y fluorescencia) y se evaluó su efecto citotóxico al ser incorporados en una matriz polimérica natural (fibroína de seda) con un material cerámico (hidroxiapatita), los cuales presentaron propiedades interesantes como es su excelente viabilidad celular mayor de 70% para su potencial aplicación médica.

FIRMA DEL ASESOR:

Dra. Blanca M. Muñoz Flores

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Materiales III, en el área de posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Blanca M. Muñoz Flores.

Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) 304610 y fue complementado con una estancia corta con la colaboración del Dr. Hernane da Silva Barud, en UNESP (Universidade Estadual Paulista)/UNIARA (Universidade de Araraquara), en SP, Brasil.

DIVULGACIÓN DEL PROYECTO Y ESTANCIA REALIZADA

El estudio realizado en esta tesis fue presentado en un congreso Internacional y tres más en colaboración; además de un artículo como producto de la tesis realizada, dos más en colaboración en revistas indexadas, y dos más de divulgación:

Congresos:

Areli Abigail Molina Paredes, Blanca M. Muñoz Flores, Víctor M. Jiménez Pérez, Hernane da Silva Barud, Jesús Alfredo Lara Cerón. Evaluación de la degradación por luminiscencia de un compuesto (fibroína de seda/hidroxiapatita) mediante el uso de compuestos de boro. IV Congreso Internacional de Química e Ingeniería Verde, Monterrey, Nuevo León, realizada a cabo del **6-8 de septiembre de 2017**.

Congreso en colaboración:

Blanca M. Muñoz-Flores, **Abigail Molina-Paredes**, Víctor M. Jiménez Pérez, Alberto Gómez, and Rosa Santillán, “Luminescent silk fibroin: Synthesis, characterization, and photophysical studies of new organoboron compounds”. 2016 Southwest Regional Meeting (SWRM), **November 10-13, 2016**, Galveston, TX, USA.

Jesús Alfredo Lara Cerón, Víctor M. Jiménez Pérez, Blanca M. Muñoz Flores, **Areli Abigail Molina Paredes**, Hernane da Silva Barud. Fibroína de seda luminiscente con compuestos organoestaño derivados de bases de Schiff con potencial aplicación en ingeniería de tejidos. IV Congreso Internacional de Química e Ingeniería Verde, Monterrey, Nuevo León, realizada a cabo del **6-8 de septiembre de 2017**.

Jesús A. Lara Cerón, **Areli A. Molina Paredes**, Víctor M. Jiménez Pérez, Blanca M. Muñoz Flores. 52° Congreso Mexicano de Química, 36° Congreso Nacional de Educación Química, Puerto Vallarta, Jalisco, realizada del **26-29 de septiembre de 2017**.

Artículos:

Areli A. Molina-Paredes, Víctor M. Jiménez-Pérez, Jesús A. Lara-Cerón, Ivana Moggio, Eduardo Arias, Rosa Santillán, Mario Sánchez, Alma Suacedo-Yañez, and Blanca M. Muñoz-Flores. Fluorescent boron Schiff bases dyes for staining silk fibroin: Green synthesis, structural characterization, DFT, and photophysical properties. *Applied Organometallic Chemistry*. **2019**, 33, 1-13.

Artículos en colaboración:

Jessica C. Berrones-Reyes, Blanca M. Muñoz-Flores, **Abigail Molina-Paredes**, Marisol Ibarra Rodríguez, Alejandro Rodríguez-Ortega, H. V. Rasika Dias, Víctor M. Jiménez-Pérez. Fluorescent organotin compounds as dyes in silk fibroin (*Bombyx mori*): Synthesis, Chemo-Optical Characterization, Cytotoxicity, and Confocal Fluorescence Microscopy. *New J. Chem.* **2019**, 43, 5150-5158.

J. A. Lara-Cerón, V. M. Jiménez-Pérez, **A. A. Molina-Paredes**, H. V. Rasika-Dias, A. Chávez-Reyes, H. R. Paudel, M. E. Ochoa, and B. M. Muñoz-Flores. Luminescent Silk Fibroin with Organotin Compounds from Amino Acid Schiff Bases – Microwave-Assisted Synthesis, Chemo-Optical Characterization, Cytotoxicity, and Confocal Microscopy. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 2818–2827.

Artículos de divulgación:

Alejandro Rodríguez-Ortega, Víctor Manuel Jiménez-Pérez, Blanca Margarita Muñoz-Flores, María Concepción García-López, Rodrigo Chan-Navarro, Jesús Alfredo Lara-Cerón, **Areli Abigail Molina-Paredes** y Rosario Melina Barrón-Yáñez. Fibroína y sericina de capullos de *Samia Cynthia ricini* Drury, 1779 (Lepidoptera: saturniidae) y *Bombyx mori* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: bombycidae), y tinción intrínseca de larvas con compuestos de estaño. *Entomología mexicana*. **2016**, 3, 136-141.

B. M. Muñoz Flores, **A. Molina Paredes**, J. Lara Cerón and V. M. Jiménez Pérez. Recent advances of synthesis of Boron derivatives and their applications in bioimaging. *International Journal Of Advances In Medical Biotechnology*. **2018**, 17-21.

Se realizó una estancia corta:

20 de febrero – 26 de agosto 2017 en los laboratorios de (Universidade de Araraquara) and UNESP (Universidade Estadual Paulista), ambos en la ciudad de Araraquara, San Paulo, Brasil. Bajo la dirección del Dr. Hernane da Silva Barud

CONTENIDO

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. | ANTECEDENTES | 7 |
| 2.1. | Biomateriales de fibroína de seda-hidroxiapatita | 8 |
| 2.2. | Visualización por luminiscencia de la degradación de biomateriales | 10 |
| 3. | HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 17 |
| 3.2. | Objetivo general: | 18 |
| 3.3. | Objetivos específicos: | 18 |
| 4. | METODOLOGÍA GENERAL | 19 |
| 4.1. | REACTIVOS Y EQUIPOS | 20 |
| 4.2. | SÍNTESIS DE COMPUESTOS DE BORO | 21 |
| 4.3. | CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE BORO | 22 |
| 4.3.1. | <i>ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN (EMAR)</i> | 22 |
| 4.3.2. | <i>DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FOTOFÍSICAS</i> | 23 |
| 4.3.3. | <i>ESTUDIO DE FOTOESTABILIDAD Y ESTABILIDAD EN MEDIO ACUOSO</i> | 23 |
| 4.3.4. | <i>DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD</i> | 23 |
| 4.4. | OBTENCIÓN DE LOS COMPÓSITOS SF/B/HA | 24 |
| 4.4.1. | <i>SOLUCIÓN DE FIBROÍNA DE SEDA</i> | 24 |
| 4.4.2. | <i>EXTRACCIÓN DE LA FIBROÍNA</i> | 24 |
| 4.4.3. | <i>PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE LA FIBROÍNA LÍQUIDA</i> | 25 |
| 4.5. | CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPÓSITOS DE SF/B/HA | 27 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.5.1. | <i>MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO</i> | 27 |
| 4.5.2. | <i>CAPACIDAD DE ABSORCIÓN</i> | 27 |
| 4.5.3. | <i>ESPECTROSCOPIA DE IR</i> | 27 |
| 4.5.4. | <i>DIFRACCIÓN DE RAYOS X EN POLVO</i> | 28 |
| 4.5.5. | <i>CITOTOXICIDAD DE LOS COMPÓSITOS</i> | 28 |
| 4.5.6. | <i>EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN</i> | 29 |
| 4.6. | <i>DISPOSICIÓN DE RESIDUOS</i> | 30 |
| 5. | <i>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</i> | 31 |
| 5.1. | <i>COMPUESTOS DE BORO</i> | 32 |
| 5.1.1. | <i>DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE MONOCRISTAL</i> | 32 |
| 5.1.2. | <i>ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN (EMAR)</i> | 35 |
| 5.1.3. | <i>RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)</i> | 39 |
| 5.1.4. | <i>PROPIEDADES ÓPTICAS</i> | 42 |
| 5.1.5. | <i>FOTOESTABILIDAD Y ESTABILIDAD EN MEDIO ACUOSO</i> | 44 |
| 5.1.6. | <i>ANÁLISIS CITOTÓXICO DE LOS COMPUESTOS DE BORO</i> | 46 |
| 5.1.7. | <i>COMPÓSITOS SF/B/HA</i> | 47 |
| 5.1.8. | <i>MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)</i> | 48 |
| 5.1.9. | <i>ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO</i> | 50 |
| 5.1.10. | <i>DIFRACCIÓN DE RAYOS X EN POLVO</i> | 51 |
| 5.1.11. | <i>CAPACIDAD DE ABSORCIÓN</i> | 52 |
| 5.1.12. | <i>CITOTOXICIDAD DE LOS BIOMATERIALES</i> | 53 |
| 5.1.13. | <i>MICROSCOPIA POR FLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL</i> | 54 |
| 5.1.14. | <i>EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN POR SEM</i> | 55 |

| | | |
|---------|---|----|
| 5.1.15. | <i>ESPECTROSCOPÍA DE IR DE LA DEGRADACIÓN</i> | 56 |
| 6. | CONCLUSIONES | 57 |
| 7. | SECCIÓN EXPERIMENTAL DETALLADA | 60 |
| 8. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 63 |
| 9. | ANEXOS | 72 |
| 9.1. | <i>ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (METODOLOGIA)</i> | 73 |
| 9.2. | <i>ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (DISCUSIÓN)</i> | 73 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-------|
| Figura 1. Compuestos de boro tetracoordinados..... | XVIII |
| Figura 2. Clasificación de los biomateriales. | 3 |
| Figura 3. Principales morfologías de biomateriales de la fibroína de seda..... | 4 |
| Figura 4. Crecimiento celular en biomateriales de fibroína de seda/hidroxiapatita (esponjas). ⁴¹ .. | 9 |
| Figura 5. Compósitos de fibroína de seda/np de hidroxiapatita (10, 20, 30 y 40%). ⁴² | 10 |
| Figura 6. Degradación por método de fluorescencia de PLA/PGA por microscopia de fluorescencia. ⁴³ | 11 |
| Figura 7. Degradación de andamios de quitosano. ⁴⁴ | 12 |
| Figura 8. Degradación de polímeros sintéticos (PLA y PGA) teñidos con isotiocianato de fluoresceína. ⁴⁵ | 13 |
| Figura 9. Compuestos tipo BODIPY empleados en células Hela con viabilidad de 90.5%. | 14 |
| Figura 10. Compuestos tipo BODIPY con viabilidad de 96%..... | 14 |
| Figura 11. Compuestos de boro mono y bidentados con viabilidad celular mayor del 96%. | 15 |
| Figura 12. Serie de compuestos de boro derivados de bases de Schiff..... | 16 |
| Figura 13. Degradación de los biomateriales en solución de PBS bajo condiciones fisiológicas. | 29 |
| Figura 14. Estructura de rayos X de monocristal del ligante L1..... | 32 |
| Figura 15. Interacciones intramoleculares y representación de la no planalidad en L1..... | 34 |
| Figura 16. Interacciones intermoleculares para el ligante L1 en forma de hélice..... | 35 |
| Figura 17. Espectro de masas de alta resolución para el compuesto 1. | 37 |
| Figura 18. Comparación de distribuciones isotópicas teóricas/experimentales del compuesto 1. | 38 |
| Figura 19. Espectro de RMN de ¹ H NMR (400 MHz, CHCl ₃) para el compuesto 1..... | 39 |
| Figura 20. Espectro de RMN de ¹³ C NMR (100 MHz, CHCl ₃) para el compuesto 1..... | 40 |

| | |
|---|----|
| Figura 21. Espectro de RMN de ^{11}B para el compuesto 1. | 41 |
| Figura 22. Espectros de absorción (línea punteada) y emisión (línea sólida) de los compuestos de boro. | 43 |
| Figura 23. Fotoestabilidad de los compuestos de boro 1-3 en acetonitrilo bajo una irradiación de una lámpara UV de 321 nm. | 45 |
| Figura 24. Fotoestabilidad de los compuestos de boro 1-3 en solución acuosa. | 45 |
| Figura 25. Efecto citotóxico de los compuestos de boro. Células de melanoma B16F10 fueron tratadas a concentraciones de 0.1 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por 24 h. | 46 |
| Figura 26. Compósitos fibroína de seda/boro/hidroxiapatita. | 47 |
| Figura 27. Micrografía SEM de los biomateriales a resolución de 200X. | 48 |
| Figura 28. Espectro de EDS: a) SF/B/HA10% y b) SF/B/HA15%. | 49 |
| Figura 29. Espectro infrarrojo de los biomateriales y de la HA. | 50 |
| Figura 30. Difractograma XDR de los compósitos a) Control, b) B, c) SF/B/HA1%, d) SF/B/HA5%, e) SF/B/HA10% y f) SF/B/HA15%. | 51 |
| Figura 31. Capacidad de absorción de los biomateriales en PBS a pH 7.4 a diferentes tiempos, expresado en porcentaje. | 52 |
| Figura 32. Viabilidad celular (método MTT) de los biomateriales en células GM07492 durante 24h. | 53 |
| Figura 33. Imágenes de microscopia de fluorescencia de los biomateriales A) Control, B) SF/B, C) SF/B/HA1%, D) SF/B/HA5%, E) SF/B/HA10%, y F) SF/B/HA15%. | 54 |
| Figura 34. Imágenes por microscopia confocal de los biomateriales. | 54 |
| Figura 35. Imágenes de SEM de la degradación de los compósitos a 200x; a) sin tratamiento, b) 1 semana, c) 3 semanas y d) 6 semanas. | 55 |
| Figura 36. Espectro infrarrojo de los biomateriales después de 1 semana de degradación. | 56 |
| Figura 38. Curvas de TGA de los biomateriales. | 74 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | |
|---|----|
| Esquema 1. Ruta de síntesis de los compuestos de boro por método tradicional y microondas.. | 21 |
| Esquema 2. Proceso de desgomado de seda (<i>Bombix mori</i>). | 25 |
| Esquema 3. Obtención de la disolución de fibroína de seda..... | 25 |
| Esquema 4. Diálisis de fibroína de seda en casetes de diálisis. | 26 |
| Esquema 5. Centrifugación de la solución de fibroína de seda..... | 26 |
| Esquema 6. Fragmentos moleculares para los compuestos de boro 1-3. | 36 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Lista de Equipos y su ubicación..... | 20 |
| Tabla 2. Resumen de propiedades físicas de los compuestos de boro. | 22 |
| Tabla 3. Disposición de residuos generados. | 30 |
| Tabla 4. Datos cristalinos y parámetros de colección del ligante L1..... | 33 |
| Tabla 5. Longitudes de enlaces de la molécula L1 (Å)..... | 34 |
| Tabla 6. Datos de espectrometría de masas para los compuestos de boro en m/z. | 36 |
| Tabla 7. Datos de las propiedades fotofísicas de los compuestos de boro en solución (ACN). .. | 43 |

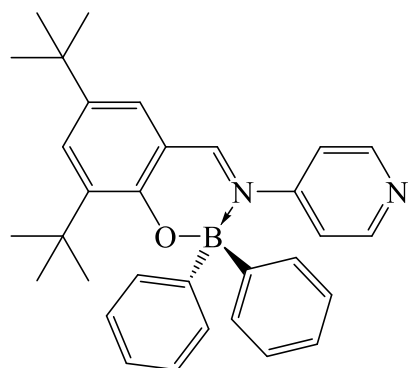
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| Abreviatura | Significado | Abreviatura | Significado |
|---------------------|---|-----------------|---|
| UV-Vis | Ultravioleta visible | m/z | Relación masa-carga |
| Ph ₂ BOH | Ácido difenilborínico | MW | Microondas |
| ACN | Acetonitrilo | MeOH | Metanol |
| HA | Hidroxiapatita | PGA | Ácido poliglicólico |
| PLA | Ácido poliláctico | PLGA | Ácido poli(láctico-co-glicólico) |
| GPa | Gigapascal | OLED | Diodo orgánico emisor de luz |
| %p/p | Porcentaje peso a peso | AISI | Acero inoxidable |
| BODIPY | 4-4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenos | mM | Milimolar |
| µg mL ⁻¹ | Microgramos sobre mililitro | B16F10 | Células de cáncer de piel-roedor |
| GM07492 | Células de fibroblastos humana | FT-IR | Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier |
| CDCl ₃ | Cloroformo deuterado | λ _{em} | Longitud de onda de emisión |

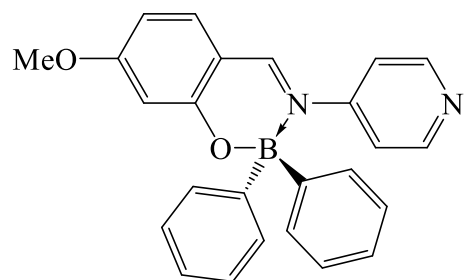
| | | | |
|--------------------------------|--|---------------------------------|--|
| λ_{abs} | Longitud de onda de absorción | EDS | Espectroscopia de energía dispersa |
| MTT | Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico | PBS | Tampón fosfato salino |
| SEM | Microscopio electrónico de barrido | cm | Centímetros |
| %p/v | Porcentaje peso a volumen | rpm | Revolución por minuto |
| SF | Fibroína de seda | Φ | Rendimiento cuántico |
| RMN | Resonancia magnética nuclear | UV-Vis | Ultravioleta-visible |
| CO ₂ | Dióxido de carbono | ppm | Partes por millón |
| M | Molaridad | HCl | Ácido clorhídrico |
| °C | Grados Celsius | mL | Mililitros |
| H ₂ SO ₄ | Ácido sulfúrico | P. F. | Punto de fusión |
| COSY | Correlación de espectroscopia | EMAR | Espectrometría de masas de alta resolución |
| ATG | Análisis termogravimétrico | mL/min | Mililitros por minutos |
| DMSO | Dimetilsulfóxido | Na ₂ CO ₃ | Carbonato de sodio |
| CaCl ₂ | Cloruro de calcio | MeOH | Metanol |
| H ₂ O | Agua | kDa | kiloDalton |

| | | | |
|------|---|------|--|
| HOMO | Orbital molecular ocupado de más energía | LUMO | Orbital molecular no ocupado de más baja energía |
| OMe | Grupo metilo | h | Horas |
| Å | Ángstrom | | |

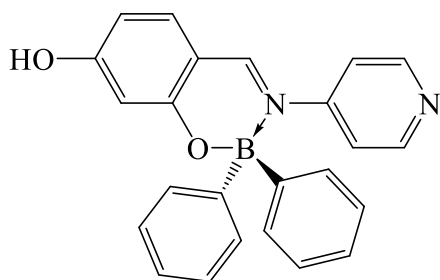
ÍNDICE DE COMPUESTOS SINTETIZADOS



1



2



3

Figura 1. Compuestos de boro tetracoordinados.

CAPÍTULO

1. INTRODUCCIÓN

Los biomateriales han mostrado una gran importancia en el área médica a nivel mundial, de acuerdo a la Sociedad Europea de Biomateriales, los biomateriales están destinados a interactuar con los sistemas biológicos para poder evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo,¹ debido a esto necesitan cumplir con ciertos requisitos como: elevada biocompatibilidad, biodegradabilidad, buenas propiedades mecánicas además de que sean manufacturables.

Los biomateriales se encuentran clasificados en tres grupos principales (Figura 2); cerámicos, polímeros sintéticos y polímeros naturales. Cada uno de estos grupos de biomateriales tiene ventajas y desventajas específicas. Dentro de los biomateriales cerámicos se encuentran la hidroxiapatita (HA) y fosfato tricálcico (TCP), estos biomateriales tienen la ventaja que presentan gran similitud química y estructural a la fase mineral del hueso por lo que son altamente aplicados en la regeneración ósea. Dentro de las desventajas que presentan se encuentran: rígidos mecánicamente, presentan muy baja elasticidad y de superficie dura y frágil. Por otra parte los biomateriales de polímeros sintéticos que se ha usado para la obtención de biomateriales incluyen al ácido poliglicólico ($\text{PGA}:\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2)_n$, ácido poliláctico ($\text{PLA}:\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2)_n$ y ácido poli(láctico-co-glicólico) ($\text{PLGA}:\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_4)_n$.² Aunque estos materiales han demostrado mucho éxito, ya que pueden ser fabricados a la medida; sus características de degradación del polímero tienen algunos inconvenientes que incluyen el riesgo al rechazo debido a la reducción de la bioactividad. Además, existen preocupaciones sobre el proceso de degradación de estos, ya que se degradan por hidrólisis, produciendo dióxido de carbono y por lo tanto la disminución del pH local que llega a la necrosis que es la muerte celular del tejido.³ El tercer grupo comúnmente utilizado es el uso de polímeros naturales; tales como colágeno, quitosano y fibroína de seda. A diferencia de los andamios a base de polímeros sintéticos, los polímeros naturales son biológicamente activos y típicamente promueven una excelente adhesión y crecimiento celular.

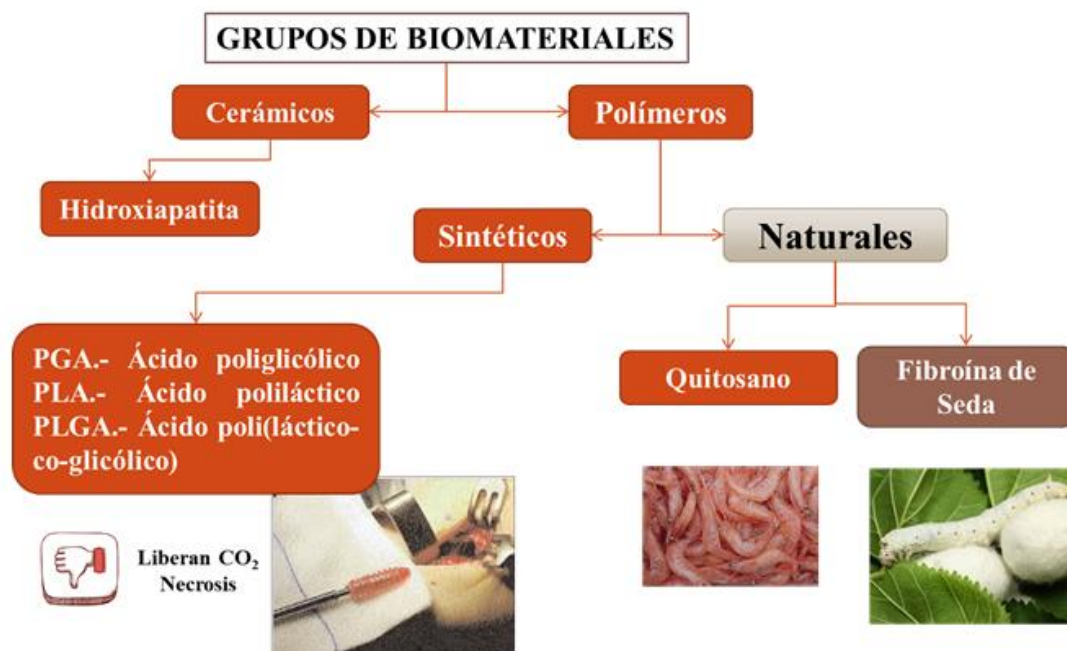


Figura 2. Clasificación de los biomateriales.

La fibroína de seda, cumple con los requisitos necesarios para ser utilizado como un biomaterial debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, y excelentes propiedades mecánicas en comparación a otros polímeros naturales (módulo de Young: 10-17 GPa).⁴ Hasta el momento se han podido obtener una serie de biomateriales a partir de fibroína con diferentes formas (Figura 3), por ejemplo en geles,⁵ esponjas,^{6,7,8} tubos,⁹ microesferas,¹⁰ fibras,^{11,12} y películas.^{13,14} Estos biomateriales tienen potenciales aplicaciones en el área médica para realizar una diversidad de andamios, tales como en piel,^{15,16} cartílago,¹⁷ y en materiales para sistema de fijación ósea.¹⁸

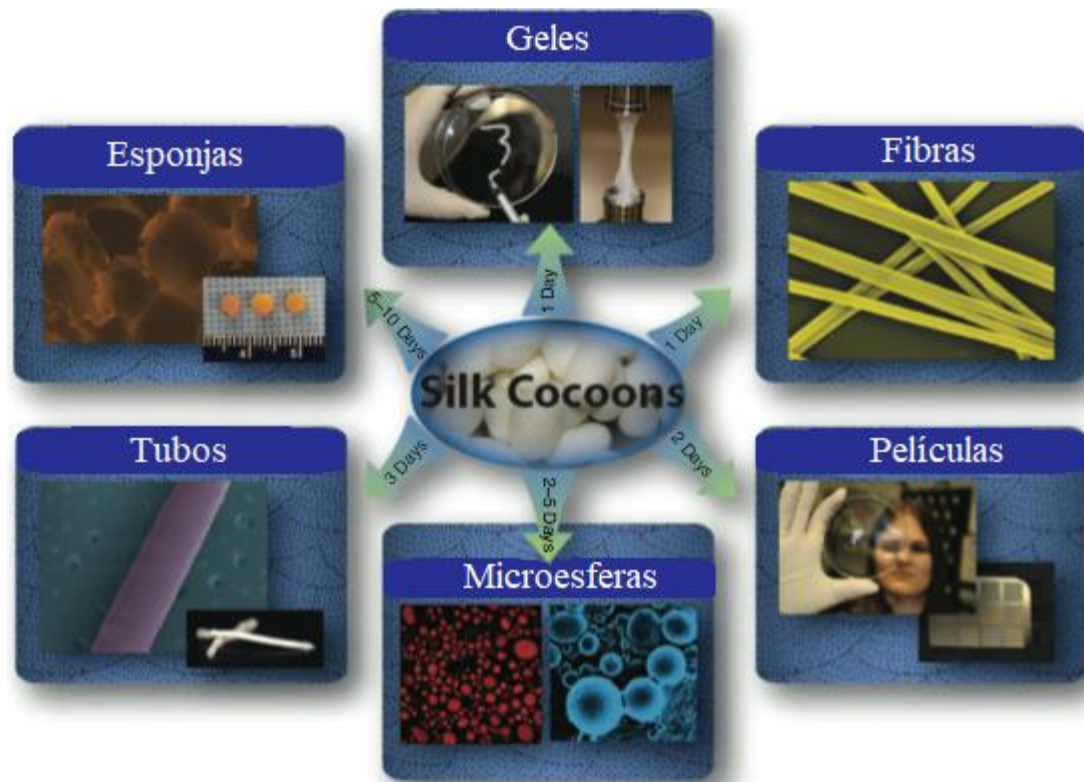


Figura 3. Principales morfologías de biomateriales de la fibroína de seda.

Sin embargo, al obtener dispositivos 100% de fibroína de seda presenta la disminución de sus propiedades mecánicas en comparación a las fibras naturales de la fibroína de seda, según sea la aplicación.¹⁹ Para lo cual es necesario reforzar los biomateriales de fibroína de seda con algún otro y obtener un compuesto el cual conseguirá la combinación de propiedades mecánicas que no es posible obtener de los materiales originales.²⁰ Un material adecuado para reforzar biomateriales de fibroína de seda es la hidroxiapatita (en bajas proporciones), ya que esta es biocompatible, lo que permite una mejor consolidación de los tejidos.²¹ y biodegradable en donde no se verifica rechazo ni respuesta inflamatoria en los tejidos donde se injerta;²² además de que se encuentra en dientes y huesos, lo cual le confiere propiedades para ser utilizado en la mejorar de la migración de células osteoblásticas, las cuales son las encargadas de la regeneración de la matriz ósea.

Hablando de biodegradación, es importante conocer el mecanismo de degradación de estos biomateriales, el cual puede ser monitoreado observando cambios respecto al tiempo; en la disminución de propiedades mecánicas, alteraciones en la morfología, generación de subproducto, pérdida de masa, y recientemente estudios por luminiscencia, el cual se basa en la visualización directa de la pérdida de la luminiscencia respecto a la degradación del material, esto con ayuda de técnicas de microscopía.

Es por ello que en los últimos años, mayores esfuerzos se han dirigido en la incorporación de compuestos luminiscentes en biomateriales en general, como por ejemplo en biomateriales de quitosano, colágeno y polímeros sintéticos, sin embargo, hasta el momento no existen reportes donde describan la incorporación de materiales luminiscentes en compósitos de fibroína de seda empleados en la fijación ósea, donde el proceso de degradación del biomaterial puede ser monitoreado, conociendo así la interacción que se presenta entre el biomaterial y los tejidos.

Los compuestos luminiscentes empleados para la evaluación de la degradación de un biomaterial son principalmente derivados de la rodamina, sin embargo, la toxicidad de los compuestos debe ser cuidadosamente controlada ($<30 \mu\text{M}$)²³ para futuras aplicaciones médicas. Por otra parte, los compuestos luminiscentes derivados de bases de Schiff específicamente los compuestos organoboro han mostrado gran interés; estos grupos imina o azometino, se obtienen de reacciones de condensación de una amina primaria con cetonas y aldehídos para la formación de un doble enlace $\text{C}=\text{N}$.²⁴ Las bases de Schiff se han estudiado ampliamente debido a que el enlace azometino actúa como un excelente agente quelante,²⁵ generando compuestos estables^{26,27} y una rápida preparación,²⁸ atrayendo la atención para aplicaciones químicas y biológicas. Dentro de sus aplicaciones más relevantes de los compuestos de boro derivados de bases de Schiff se encuentran en diferentes áreas, como sensores fluorescentes, OLEDs (diodo orgánico emisor de luz), y dispositivos fotovoltaicos orgánicos. Dentro de las aplicaciones médicas más relevantes se encuentran actividad anticancerígena,²⁹ sensores de metales

de interés biológico,³⁰ sensores fluorescentes sensibles al pH,³¹ y como marcadores celulares los cuales han mostrado baja o nula citotoxicidad.^{32,33}

Debido a sus importantes aplicaciones, es necesaria su obtención mediante una síntesis verde y sostenible como es la síntesis asistida por microondas para este tipo de compuestos, sin embargo, cabe resaltar que existen pocos reportes en la literatura sobre este tema.³⁴

Las propiedades de compatibilidad, estabilidad en condiciones ambientales, y el fenómeno de la luminiscencia, hacen que los derivados de boro sean candidatos prometedores en aplicaciones médicas, en específico, para realizar evaluación de la degradación de un biomaterial. Cabe mencionar que dentro del grupo de investigación tiene experiencia en la síntesis de compuestos de boro aplicados en el área médica, para la obtención de bioimágenes.

Con base en lo anterior, en el presente proyecto se presenta en la síntesis de tres nuevos compuestos de boro tetracoordinados derivados de bases de Schiff que presenten el fenómeno de la luminiscencia, para ser aplicados en la evaluación de la degradación de un compósito fabricado de fibroína de seda reforzado con hidroxiapatita a concentraciones diferentes (1, 5, 10 y 20% p/p) y poder obtener un biomaterial prometedor para su aplicación biomédica.

CAPÍTULO

2. ANTECEDENTES

2.1. Biomateriales de fibroína de seda-hidroxiapatita

En la actualidad los biomateriales utilizados en el área médica han tomado gran interés,³⁵ gracias a las ventajas que estos tienen, como es su buena biocompatibilidad, son biodegradables además de que tienen buenas propiedades mecánicas, en comparación de los materiales utilizados en la actualidad como es el acero inoxidable AISI 316L (*Instituto Americano del Hierro y Acero*), entre otros. Es por ello que la demanda de uso de biomateriales se ha incrementado buscando como alternativas materiales biocompatibles con el cuerpo humano y que sean biodegradables, para reducir la necesidad de retiro de los dispositivos metálicos.

Una excelente alternativa para remplazar los materiales metálicos es la fibroína de seda, este material, el cual es natural cumple con los requisitos necesarios para ser un biomaterial (biocompatible, biodegradable y con buenas propiedades mecánicas), además de que ha tomado mayor interés para aplicaciones médicas como es a través de su uso en suturas quirúrgicas utilizadas en cirugías orales, ojos y en el tratamiento de heridas de la piel.³⁶

En el 2013 Kaplan *et al.* obtuvieron biomateriales de fibroína de seda para ser aplicados como fijación ósea *in vitro* e *in vivo*, en donde estos biomateriales fueron capaz de ser utilizados como un material de fijación actual; sin embargo estos materiales presentaron disminución de sus propiedades mecánicas después de ser implantados, esto debido a la interacción con los fluidos del tejido; por lo cual para la mejora de las propiedades mecánicas se propone que es necesario reforzar la fibroína de seda, con algún otro material que le pueda mantener o mejorar sus propiedades mecánicas y puedan ser aplicados.¹⁹

Es por ello que se ha utilizado la obtención de compósitos de fibroína de seda con otros materiales tanto sintéticos como naturales; como son: el quitosan,³⁷ óxido de titanio (Ti₂O),³⁸ alumina,³⁹ hidroxiapatita,⁴⁰ entre otros. Del cual la hidroxiapatita se ha destacado por ser un mejor material biocompatible²¹ y biodegradable,²² gracias a que se

encuentra presente en dientes y huesos confiriendo una mejor migración de las células osteoblásticas para poder regenerar la matriz ósea. Novakovic, *et al.*⁴¹ obtuvieron compósitos de fibroína de seda con hidroxiapatita a 0, 1.6, 3.1 y 4.6% en peso y cloruro de sodio como agente porógeno a 0, 1.5, 3 y 4.5% en peso para obtener un biomaterial poroso (esponjas), diseñadas para inducir y apoyar la formación de la matriz ósea por las células madres mesenquimatosas humanas (hMSC) (Figura 4). Estos compósitos presentaron estructuras porosas, las cuales son capaces de inducir al crecimiento y generación de hueso.

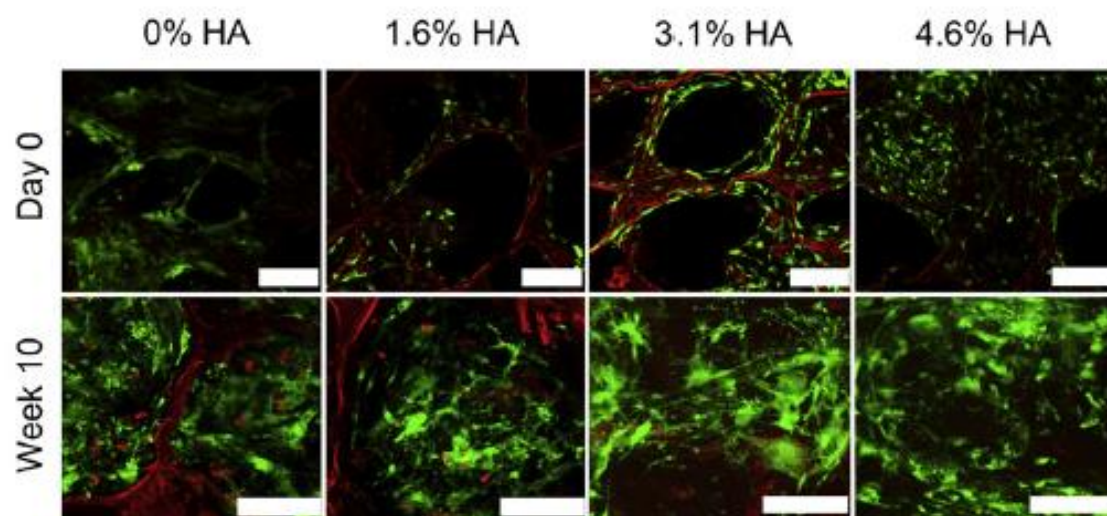


Figura 4. Crecimiento celular en biomateriales de fibroína de seda/hidroxiapatita (esponjas).⁴¹

Más adelante, en el 2014 Ryu, *et al.* reforzaron la fibroína de seda con nanopartículas de hidroxiapatita obtenidas por el método de electrohilado a diferentes concentraciones (10, 20, 30 y 40%) en peso (Figura 5), con potencial aplicación en la ingeniería de tejidos, demostrando que los compósitos menores de 20% de peso de hidroxiapatita obtuvieron mejores propiedades mecánicas, esto se debe al incremento de poros (o defectos), lo cual causa directamente la ruptura de los compósitos durante sus pruebas de tracción.⁴²

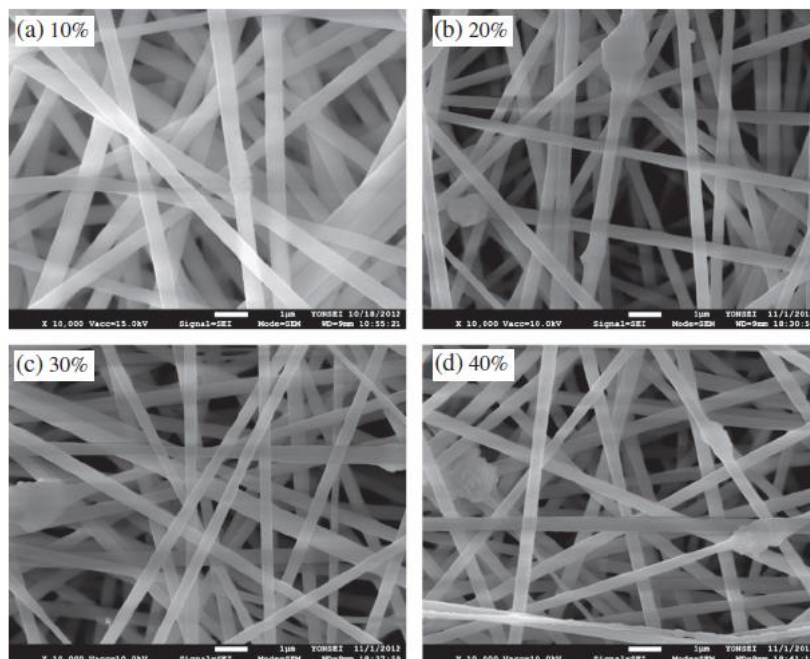


Figura 5. Compósitos de fibroína de seda/np de hidroxiapatita (10, 20, 30 y 40%).⁴²

2.2. Visualización por luminiscencia de la degradación de biomateriales

Por otra parte, el estudio de la degradación de estos biomateriales ha tomado gran interés con la finalidad de conocer su tiempo de degradación, la modificación de sus propiedades mecánicas, forma y subproductos. Como se sabe hasta el momento existen diferentes métodos de degradación en el cual se puede conocer el comportamiento de los materiales a través del tiempo, ya sea por microscopia, pérdida de peso, la evaluación de sus propiedades mecánicas y luminiscencia.³⁷ De los cuales la luminiscencia tiene la ventaja de observar la interacción del biomaterial con las células en tiempo real, además de poder tener una rápida visualización de este, mediante la microscopia confocal.¹

Cabe mencionar que actualmente existen escasos reportes del estudio de degradación por luminiscencia para biomateriales; en específico, de fibroína de seda, hasta el momento no hay reportes de este tipo de estudio. En el 2005, Yang, *et al.*

realizaron el estudio para la evaluación de la degradación de la mezcla de materiales de ácido poliláctico y ácido poliglicólico a concentraciones diferentes (50/50, 65/35 y 80/20), los cuales fueron teñidos con Rodamina B, mostrando por microscopía confocal la disminución de la intensidad de la luminiscencia antes y después de su implantación (Figura 6).⁴³

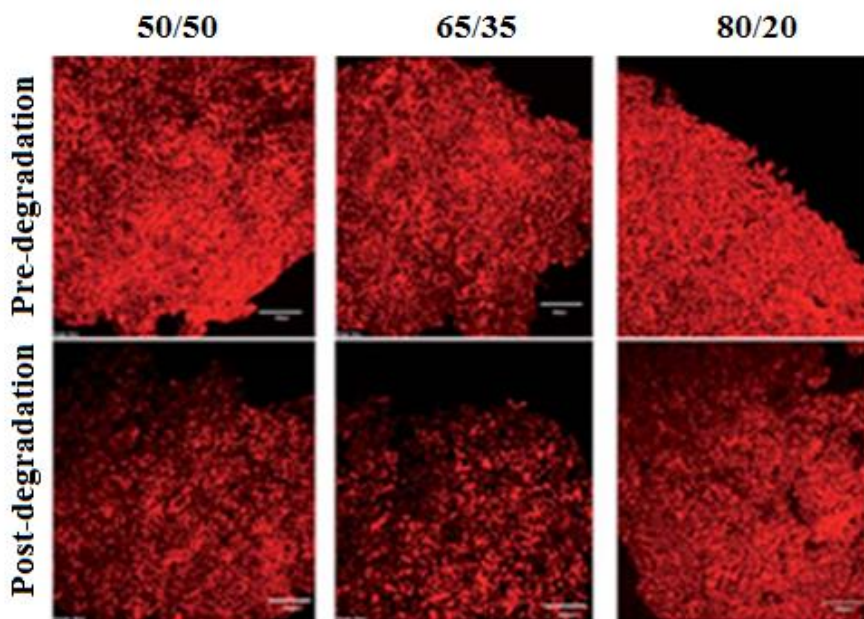


Figura 6. Degradación por método de fluorescencia de PLA/PGA por microscopia de fluorescencia.⁴³

Por otro lado, en el 2013, Reis, *et al*, obtuvieron un andamio de quitosano para su posible aplicación en la ingeniería de tejidos (Figura 7), realizaron el estudio de degradación por luminiscencia con la tinción del material con isotiocianato de fluoresceína, el cual fue observado por microscopia confocal a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6, 9, y 16 semanas), mostrando la evidencia de que la pérdida de masa está estrechamente correlacionada con la disminución de la luminiscencia, por desgaste de erosión en el material.⁴⁴

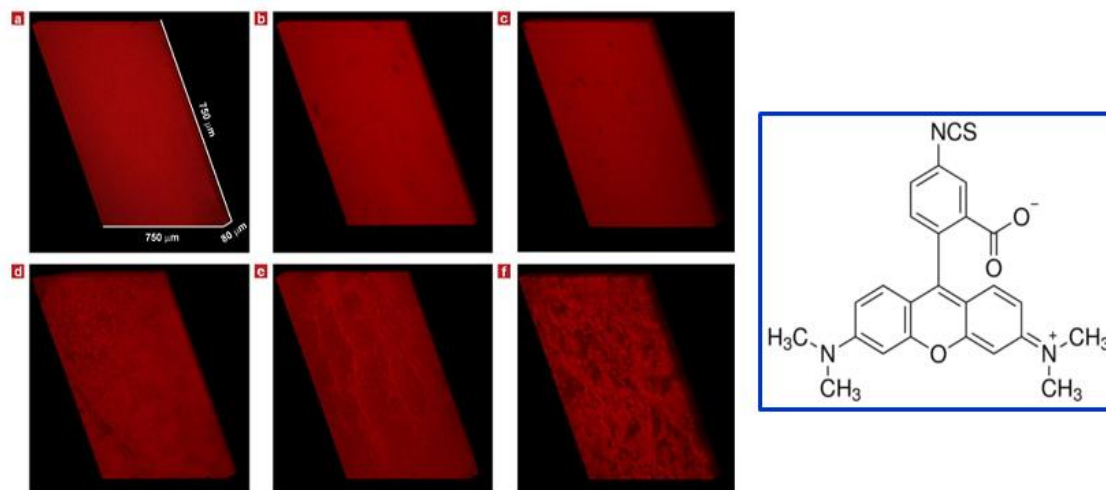


Figura 7. Degradación de andamios de quitosano.⁴⁴

Más recientemente, tiñeron materiales de ácido poliláctico y ácido poliglicólico con isotiocianato de fluoresceína por inmersión, comprobando de igual manera que la degradación de los materiales está relacionada con la disminución o pérdida de la luminiscencia (Figura 8). Sin embargo, es de gran importancia conocer el efecto citotóxico que tienen los compuestos para evaluar la degradación por luminiscencia, ya que los compuestos luminiscentes derivados de la rodamina son materiales tóxicos; siendo así un material inapropiado para ser utilizado en biomateriales.⁴⁵

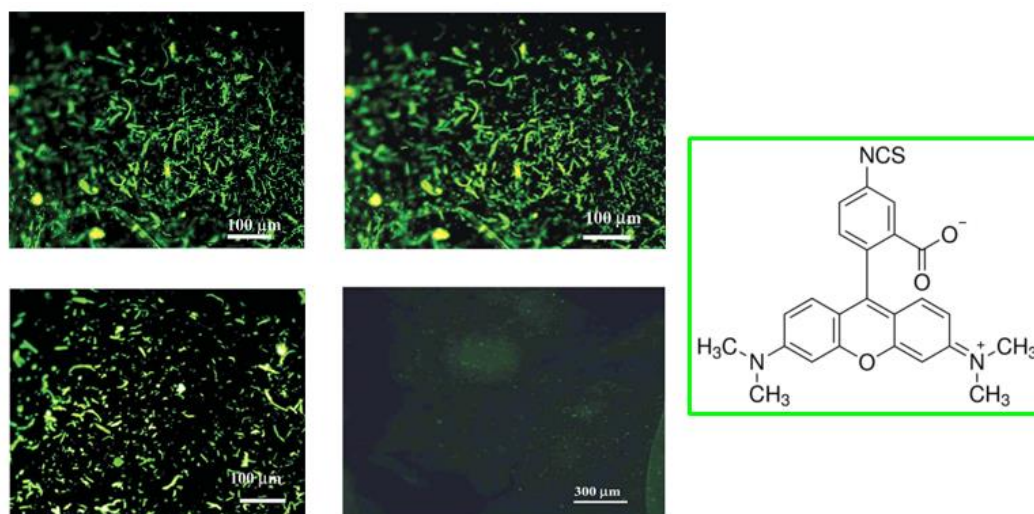


Figura 8. Degradación de polímeros sintéticos (PLA y PGA) teñidos con isotiocianato de fluoresceína.⁴⁵

Por ello la investigación se ha centrado en la búsqueda de nuevos pigmentos que no muestren toxicidad, como lo son los compuestos de boro, gracias a que este tipo de compuestos presentan baja o nula citotoxicidad. Los cuales han sido utilizados para aplicaciones médicas específicamente como marcador fluorescente en células. Por otra parte, se ha observado la administración de fármacos prometedores derivados de compuestos de boro, que muestran alta actividad de liberación del fármaco. Adicionalmente tienen potencial aplicación en imágenes de fluorescencia y quimioterapia. En el 2015, Liu, *et al.* realizaron la liberación del fármaco contra el cáncer, observando un efecto significativo contra células Hela (células de cáncer cérvico-uterino), observadas por microscopia confocal. De igual manera se demostró en estudios de citotoxicidad el efecto citotóxico, con una viabilidad mayor del 90.5% a una concentración mayor a $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ después de 48 h de incubación (Figura 9).⁴⁶

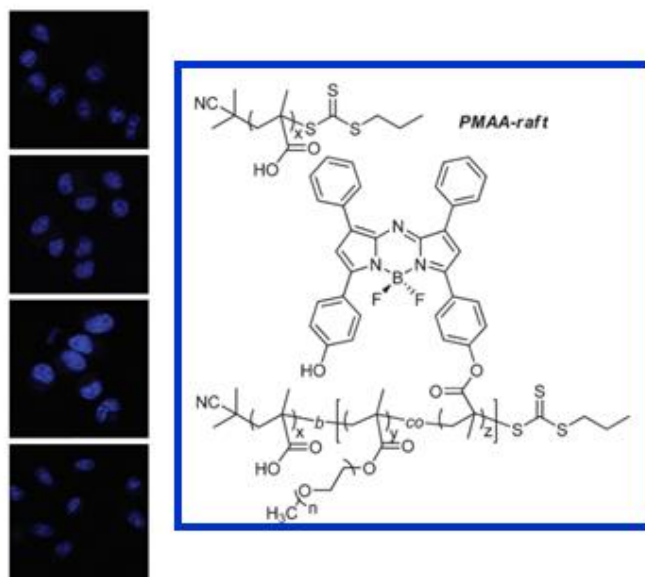


Figura 9. Compuestos tipo BODIPY empleados en células Hela con viabilidad de 90.5%.

Así mismo recientes estudios demostraron que los compuestos de boro derivados del colorante BODIPY (*borodipirrometano*) fusionado con el naftaleno y antraceno, sintetizados bajo atmósfera de argón, presentaron viabilidad celular mayor al 96%, después de la incubación durante 4 h a 10 mM (Figura X).⁴⁷

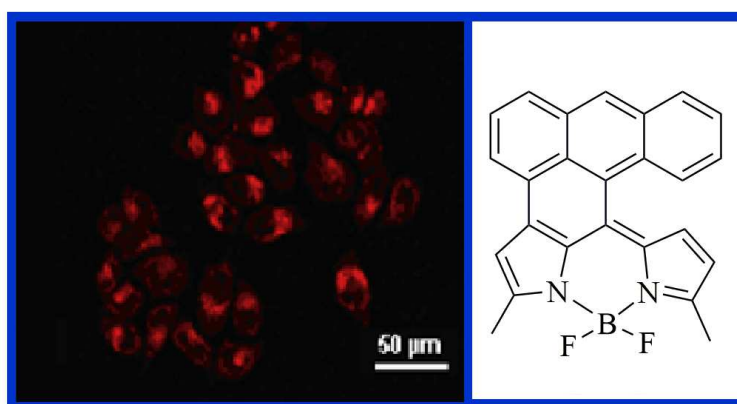


Figura 10. Compuestos tipo BODIPY con viabilidad de 96%.

En cuanto al grupo de investigación, se tiene la experiencia de trabajar con dichos compuestos. En el 2013 se reportó la síntesis de cuatro compuestos luminiscentes de boro, los cuales presentaron emisión de fluorescencia $<1\%$.⁴⁸

En el presente proyecto se propuso mejorar la emisión de los compuestos de boro, esto se logró haciendo que el átomo de boro ocupe una posición dentro del plano que incluye al ligante y logrando una mayor fluorescencia a lo ya reportado en el grupo de investigación. Por otra parte, se ha reportado la síntesis de una serie de compuestos de boro con aplicaciones en bioimágenes, mostrando una viabilidad celular mayor al 98%, incubadas durante 24 h a $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 11).⁴⁹ Lo cual comprueba que los compuestos derivados del átomo de boro son ideales para ser utilizados en aplicaciones médicas.

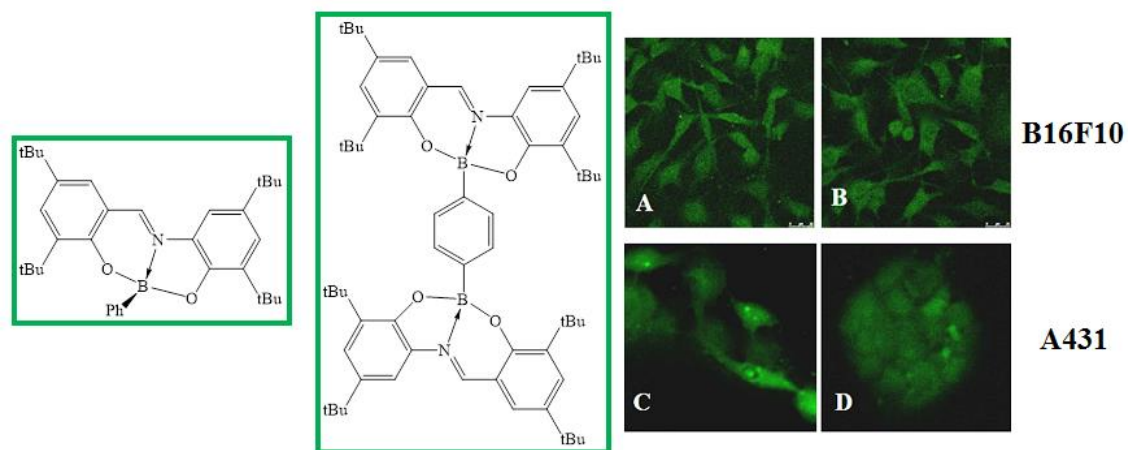


Figura 11. Compuestos de boro mono y bidentados con viabilidad celular mayor del 96%.

Por lo ya mencionado anteriormente, este trabajo de investigación está enfocado en sintetizar nuevos compuestos luminiscentes de boro (Figura 12), con baja o nula citotoxicidad, para ser utilizados en la evaluación de la degradación por luminiscencia de un compósito de fibroína de seda (*Bombix mori*) con hidroxiapatita, utilizando concentraciones diferentes (0, 1, 5, 10 y 20% en peso de HA), con la finalidad de brindar un mejor material biocompatible gracias a la combinación de las propiedades (biodegradabilidad, maleabilidad y propiedades mecánicas) de ambos materiales.

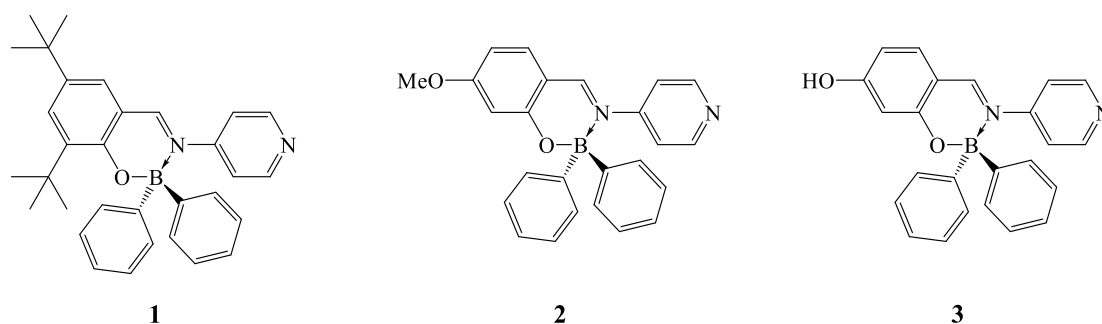


Figura 12. Serie de compuestos de boro derivados de bases de Schiff.

CAPÍTULO

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

Los nuevos compuestos de boro tetracoordinados derivados de bases de Schiff presentan el fenómeno de la luminiscencia para su potencial aplicación en la evaluación de la degradación de un compósito de fibroína de seda reforzado con hidroxiapatita.

3.2. Objetivo general:

Sintetizar nuevos compuestos de boro para ser aplicados en la evaluación de la degradación de un compósito de fibroína de seda reforzado con hidroxiapatita.

3.3. Objetivos específicos:

- Sintetizar nuevos compuestos de boro luminiscentes derivados de bases de Schiff.
- Caracterizar los compuestos mediante técnicas de espectroscopia de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C y ^{11}B , espectrometría de masas de alta resolución (EMAR), determinación de propiedades ópticas y difracción de Rayos X de monocristal.
- Determinar la citotoxicidad de los compuestos de boro.
- Obtener el compósito de fibroína de seda (*Bombyx mori*) reforzado con hidroxiapatita a diferentes concentraciones.
- Caracterizar los compósitos por diferentes técnicas (FTIR y XDR).
- Evaluar la morfología por microscopia electrónica de barrido del compósito antes y después de la degradación.
- Realizar la evaluación de la degradación por microscopia confocal.

CAPÍTULO

4. METODOLOGÍA GENERAL

4.1. REACTIVOS Y EQUIPOS

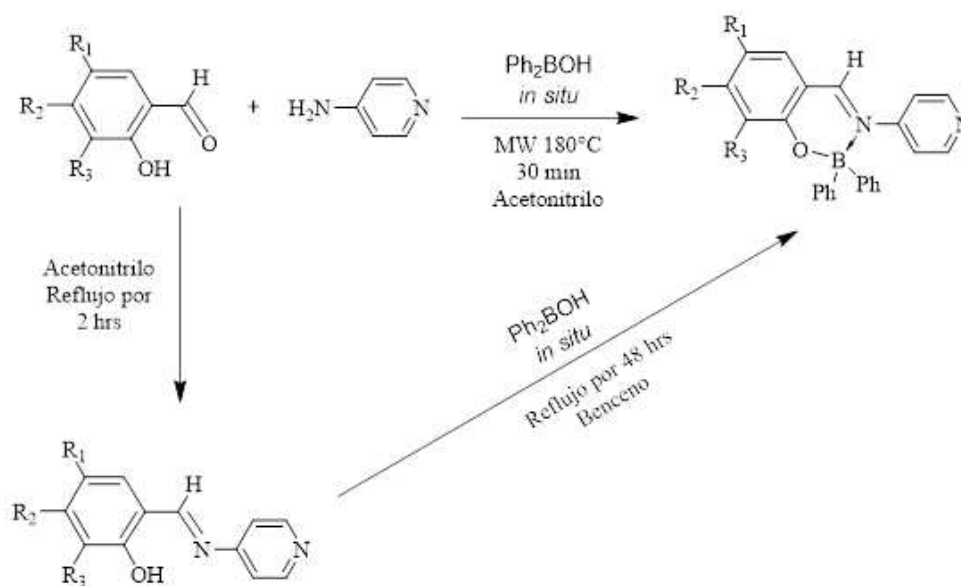
La realización de este proyecto de tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Materiales III, en el área de posgrado de Facultad de Ciencias Químicas de la UANL. Los reactivos que se utilizaron para la síntesis de los compuestos de boro fueron adquiridos de la casa comercial Aldrich. La caracterización molecular de los compuestos de boro se realizó en diferentes equipos localizados en la Facultad de Ciencias Químicas y Medicina de la UANL, en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). La caracterización correspondiente a los compósitos se llevó a cabo en la Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araraquara, SP, Brasil. En la Tabla 1 se desglosa los equipos y su ubicación.

Tabla 1. Lista de Equipos y su ubicación

| Resultados | Equipo | Ubicación |
|--|--|--------------------------------------|
| Espectros de RMN de ^1H , ^{13}C y ^{11}B . | Bruker advance DPX 400 | Facultad de Medicina - UANL |
| Espectro de masa | AB Sciex API 2000 TM Sistema LC/MS/MS | CINVESTAV-IPN (DF) |
| Difracción de Rayos-X | Bruker SMART APEX CCD | |
| Espectros de absorción UV-Vis | Espectrofotometro: Perkin-Elmer Lambda 365 | Facultad de Ciencias Químicas - UANL |
| Espectros de emisión | Espectrofotómetro: Horiba Scientific Fluorolog-3 | Facultad de Ciencias Químicas – UANL |
| Microscopia electrónica de barrido | Field Emission Scanning Electron Microscope JEOL JSM-7500F | Universidade Estadual Paulista |
| Espectro de IR | Perkin Elmer Spectrum 100 | Universidade Estadual Paulista |
| Difracción de Rayos-X en polvo | Siemens Kristalloflex | Universidade Estadual Paulista |




4.2. SÍNTESIS DE COMPUESTOS DE BORO

Los tres nuevos compuestos de boro fueron sintetizados por dos diferentes rutas de síntesis; por método tradicional y mediante síntesis asistida por microondas por multicomponentes. Para el método tradicional se realizó en dos pasos, primero fueron sintetizados los ligantes mediante condensación de un aldehído y la aminopiridina en acetonitrilo por 2 h; posteriormente se realizó la reacción con el correspondiente ligante más el ácido difenilborónico en benceno por 48 h a reflujo, utilizando trampa de Dean-Stark, removiendo el agua formada mediante una destilación azeotrópica para la obtención de los compuestos de boro. En cuanto a la síntesis asistida por microondas, se llevó a cabo por multicomponentes en un reactor de microondas marca AntonPaar Monowave 300® a un poder de 400W y 20 bars a partir de aminopiridina, ácido difenilborónico y el respectivo aldehído, por 30 minutos utilizando acetonitrilo como disolvente. (Esquema 1). El progreso de la reacción fue monitoreado por cromatografía de capa fina cada 12 h para el método tradicional y cada 5 minutos para el método por microondas. Los datos analíticos de los compuestos de boro se resumen en la Tabla 2.



Esquema 1. Ruta de síntesis de los compuestos de boro por método tradicional y microondas.

Tabla 2. Resumen de propiedades físicas de los compuestos de boro.

| Compuesto | Aspecto | Rend. Químico (MW) | Rend. Químico (Tradicional) | P. F. |
|-----------|---|--------------------|-----------------------------|------------|
| 1 | Sólido color rojo  | 95 % | 48 % | 78-80 °C |
| 2 | Sólido color amarillo  | 87 % | 62 % | 98-100 °C |
| 3 | Sólido color amarillo  | 83 % | 53 % | 126-128 °C |

4.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE BORO

4.3.1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN (EMAR)

Los espectros de masas de alta resolución fueron obtenidos mediante una técnica de análisis cualitativo, en un equipo de Agilent Technologies, la cual está basada en la obtención de iones $(M+H)^+$ a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su masa y su carga, y finalmente se detectan por medio de un analizador de tiempo de vuelo (TOF), empleando ionización química a presión atmosférica (APCI) como fuente de iones.

4.3.2. DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FOTOFÍSICAS

Las propiedades fotofísicas se llevaron a cabo en acetonitrilo (ACN) de grado espectroscópico de Aldrich a temperatura ambiente. Los espectros de absorción UV-Vis se midieron en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 365, con lámparas de deuterio y de tungsteno. Los espectros de emisión se determinaron en un fluorómetro Horiba Scientific Fluorolog-3; la longitud de onda de excitación fue de 10 nm más baja que el máximo de absorción. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ) se determinaron en solución de acuerdo con el procedimiento ya reportado⁵⁰ y utilizando sulfato de quinina en H₂SO₄ 0.1 M ($\Phi = 0.54$ a 310 nm) como estándar. Se realizaron tres soluciones con absorbancia en la longitud de onda máxima inferior a 0.1 para cada muestra y se promedió el rendimiento cuántico.

4.3.3. ESTUDIO DE FOTOESTABILIDAD Y ESTABILIDAD EN MEDIO ACUOSO

La evaluación de la fotoestabilidad de los compuestos organoboro se realizó en acetonitrilo y la estabilidad en medio acuoso en agua destilada (1% v/v de DMSO) a una concentración de 4×10^{-5} M. A lo que corresponde a la fotoestabilidad la muestra en solución se irradió con luz UV de 312 nm en un Transiluminador Spectroline TD-1000R y se obtuvo su espectro de absorción cada 15 min durante 1 hora. De la misma forma se llevó a cabo la estabilidad en medio acuoso, sin embargo, en este caso sin luz UV.

4.3.4. DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

La citotoxicidad de los compuestos de boro se determinó mediante el ensayo de azul Alamar, el cual consiste en un reactivo (resazurina) compuesto no tóxico,

permeable a las células y de color azul no fluorescente. Al entrar en las células, la resazurina se reduce a resorufina, que produce fluorescencia roja muy brillante o rosa, por reacción de óxido-reducción que se encuentran principalmente en la mitocondria de células vivas. Las células viables realizan esta reacción, generando así una medida cuantitativa de la viabilidad o citotoxicidad. Se sembraron células de melanoma murino en placas de 96 pocillos a una densidad de 1×10^4 células por pocillo en 100 μL de medio y se incubaron durante 24 h a 37°C . El medio fue cambiado y se añadieron los compuestos a concentraciones de 0,1 hasta 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como controles se usaron células no tratadas o tratadas con dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO). 24h más tarde se añadieron 10 mL de azul alamar (Biosource Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) a cada pocillo. La viabilidad de los cultivos se midió como cambio de color de reactivo por espectrofotometría en un lector de microplacas ELISA (Biotek Multiskan ELX800, BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT) a longitudes de onda duales de 570 y 600 nm de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

4.4. OBTENCIÓN DE LOS COMPÓSITOS SF/B/HA

4.4.1. SOLUCIÓN DE FIBROÍNA DE SEDA

4.4.2. EXTRACCIÓN DE LA FIBROÍNA

La obtención de la solución de fibroína de seda se encuentra estipulada por Danielle N. Rockwood *et al.*⁵¹ Los capullos de seda producidos por el gusano de seda *Bombix mori* fueron desgomados por incubación en una solución de Na_2CO_3 0.02M a 100°C durante 30 min; posteriormente la seda desgomada se dejó enfriar a temperatura ambiente y se enjuagó tres veces con agua destilada para eliminar los residuos de la sericina, después se dejó secar a 60°C durante 12h (Esquema 2).



Esquema 2. Proceso de desgomado de seda (*Bombyx mori*).

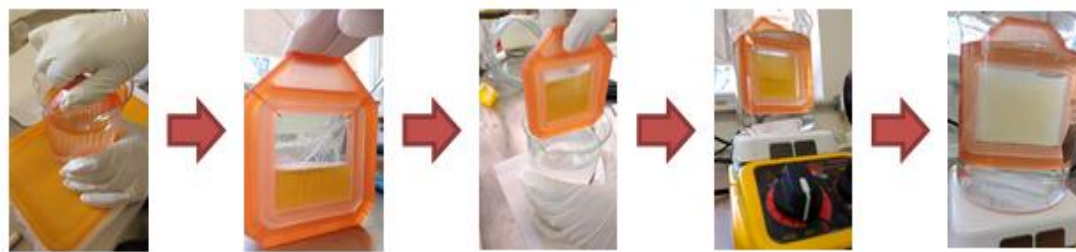
4.4.3. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE LA FIBROÍNA LÍQUIDA

Para la preparación de la solución de la fibroína de seda, se inició colocando la fibroína previamente desgomada a baño maría a 85 °C, disolviendo las fibras en una solución de $\text{CaCl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:2:8) en una proporción de 1g de fibroína de seda a 10 mL de solución; hasta obtener una solución color ámbar, garantizando el desacomodo del arreglo cristalino de la fibroína de seda (Esquema 3).



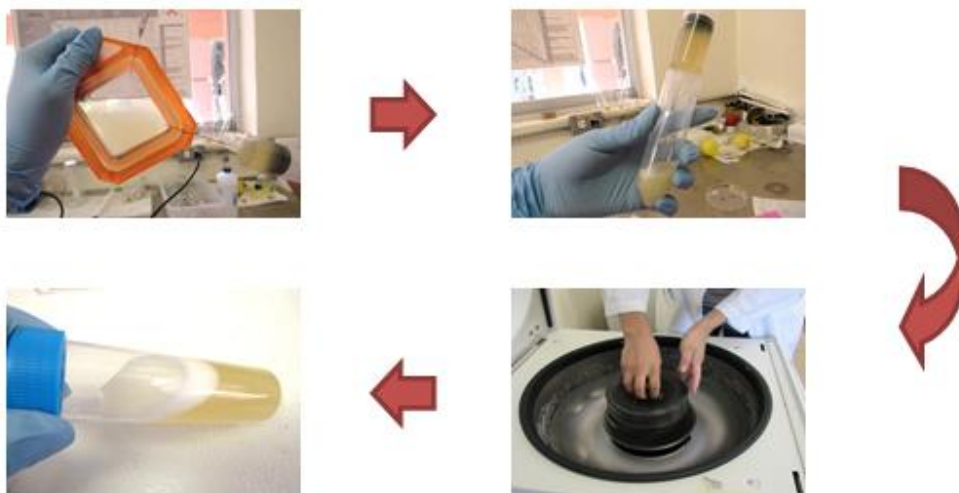
Esquema 3. Obtención de la disolución de fibroína de seda.

Posteriormente la solución de la fibroína de seda, se llevó a cabo su diálisis mediante casetes de diálisis de membrana de celulosa de 10KDa en agua destilada, realizando cambios del agua a diferentes tiempos (1, 2, 4, 12, 24 y 48 h), con el objetivo de eliminar la sal de CaCl_2 (Figura 4).



Esquema 4. Diálisis de fibroína de seda en casetes de diálisis.

Consecutivamente de realizar la diálisis de la solución de fibroína de seda, se centrifugó a 20000 rpm a 4 °C por 20 minutos para eliminar cualquier partícula ajena a la fibroína de seda (Esquema 5). La concentración final de la solución acuosa de la fibroína de seda fue de 4.5 % (p/v).



Esquema 5. Centrifugación de la solución de fibroína de seda.

4.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPÓSITOS DE SF/B/HA

4.5.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) se obtuvieron con el uso de un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo modelo JEOL JSM-7500F. Los andamios liofilizados se seccionaron cuidadosamente en el plano horizontal con una cuchilla de afeitar, se montaron en cinta adhesiva conductora en cobre y se recubrieron por pulverización con una capa de carbono.

4.5.2. CAPACIDAD DE ABSORCIÓN

La absorción de los compósitos se evaluó en un dispositivo tipo Enslin–Neff.⁵² Las piezas de los andamios se pesaron y se vertieron cuidadosamente sobre el filtro del embudo; en una solución salina de buffer fosfato salino (PBS) pH 7.4; para cada andamio se realizaron tres pruebas para verificar la reproductibilidad. Los cambios de volumen de líquido fueron medidos por una pipeta graduada del dispositivo; la medición de la capacidad de absorción fue monitoreada a diferentes tiempos (1, 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360 y 480 min). La capacidad de absorción se calculó mediante la siguiente ecuación: capacidad de agua (%) = $[(W_s - W_d)/W_s] \times 100$, donde W_d es el peso del compósito inicial y W_s es el peso del compósito después de los diferentes tiempos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se calculó la desviación estándar.

4.5.3. ESPECTROSCOPIA DE IR

Los espectros FT-IR de los compósitos se adquirieron utilizando un espectrómetro Perkin Elmer Spectrum 100 en modo ATR. Se cortó una muestra de los biomateriales de aproximadamente de 0.5 cm² para su medición. Los espectros se

recolectaron en el rango de $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ con una acumulación de 32 scans, con una resolución de 4 cm^{-1} e intervalos de 0.5 cm^{-1} .

4.5.4. DIFRACCIÓN DE RAYOS X EN POLVO

Los difractogramas de rayos X en polvo se obtuvieron en un difractómetro Siemens Kristalloflex utilizando radiación de $\text{Cu K}\alpha$ filtrada con níquel de 4° a 36° (ángulo de 2θ), en ángulos de Bragg igual a 0.02° y a un tiempo de 3 s.

4.5.5. CITOTOXICIDAD DE LOS COMPÓSITOS

La citotoxicidad de los compósitos FS/B/HA, se realizó utilizando líneas celulares de fibroblastos humanos GM7592 mediante el ensayo de Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico (MTT) para evaluar la viabilidad. Primero, las muestras se cortan en círculos de aproximadamente 5 mm de diámetro y se esterilizan en luz UV durante 6 h. Después de ser esterilizados las muestras fueron acondicionados en una placa de cultivo de células de 96 pocillos. Sobre las muestras, se sembraron células de fibroblastos humanos a una densidad de 5×10^4 células por pocillo y se mantuvo en condiciones de cultivo durante 24h a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO_2 y 95% de aire atmosférico. Después de las 24h las muestras fueron lavadas con PBS, y se añadieron 50 μL de MTT, la placa fue nuevamente incubada a 37°C durante 4h. Después de 4 h, 100 μL de isopropanol se añadieron a los pocillos y homogeneizaron suavemente para la solución. Los valores de densidad óptica (DO) se obtuvieron a una longitud de onda de 570 nm en los espectrofotómetros, y se convirtieron en porcentajes de viabilidad celular relativa a la muestra control negativo. Todas las muestras fueron evaluadas por triplicado para comprobar su reproductibilidad.

4.5.6. EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN

La evaluación de la degradación se llevó a cabo por triplicado en diferentes tiempos (1, 3 y 6 semanas), en una solución de PBS (pH 7,4) a 37 °C para tener una similitud con los fluidos fisiológicos encontrados en el cuerpo humano (Figura 13). Posterior al tiempo de degradación, los biomateriales fueron lavados con agua destilada y se dejaron secar por 12h a 60°C; posteriormente se llevó a cabo un estudio cualitativo mediante IR y SEM.



Figura 13. Degradación de los biomateriales en solución de PBS bajo condiciones fisiológicas.

4.6. DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

La disposición de residuos generados en el laboratorio fue de acuerdo al procedimiento de manejo y gestión de residuos peligrosos establecidos en la Facultad de Ciencias Químicas como se indica en la Tabla 3.

Tabla 3. Disposición de residuos generados.

| Residuo | Tipo | Disposición |
|----------------------------|-----------------------------------|--------------|
| Metanol, Éter, Hexano | Disolventes Orgánicos | Contenedor C |
| Diclorometano | Disolventes Orgánicos Halogenados | Contenedor C |
| Aminas | Aminas | Contenedor C |
| Ácidos y Bases inorgánicos | Ácidos y Bases inorgánicos | Contenedor A |

CAPÍTULO

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1. COMPUESTOS DE BORO

Los compuestos de boro fueron caracterizados por espectrometría de masas de alta resolución, resonancia magnética nuclear, UV-Vis y fluorescencia.

5.1.1. DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE MONOCRISTAL

Se obtuvieron cristales apropiados para el ligante **L1** para determinar su estructura molecular mediante el análisis de difracción de rayos X de monocristal, la cual se muestra en la figura 14. Los datos cristalinos y parámetros de colección del ligante **L1** se encuentran en la Tabla 4, lo cual proporciona la información de un sistema cristalino trigonal con un grupo espacial $P3_2$. En la tabla 5, se puede observar los valores de las distancias de enlace más relevantes del ligante **L1**, para el enlace imínico se observa un valor de 1.426 (6) Å, la cual corresponde a valores característicos para este tipo de enlace.⁵³ Por otra parte se puede observar una repulsión de los hidrógenos en posición 2 y 6 debido a la cercanía de ambos átomos, teniendo una estructura no coplanar a 40° respecto al anillo del aldehído. Dicha estructura cristalina muestra interacción intramolecular por puente de hidrogeno entre el grupo OH y el nitrógeno imínico (Figura 15); también se puede observar interacciones intermoleculares entre el nitrógeno del anillo piridínico N1 y el hidrogeno imínico H6 dando como resultado un acomodo espacial en forma de hélice (Figura 16).

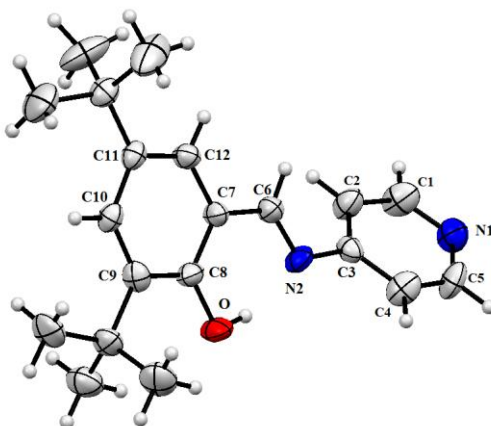


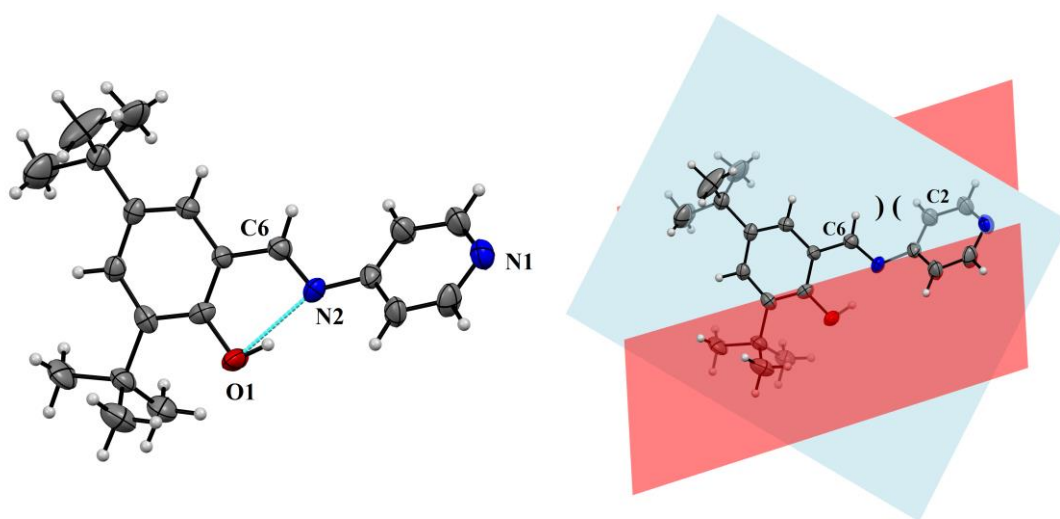
Figura 14. Estructura de rayos X de monocristal del ligante **L1**.

Tabla 4. Datos cristalinos y parámetros de colección del ligante **L1**.

| L1 | |
|---|--|
| Formula empírica | C ₂₀ H ₂₆ N ₂ O |
| Peso molecular | 310.43 |
| Temperatura, K | 293(2) |
| Long. De Onda | 0.71073 |
| Sistema cristalino | Trigonal |
| Grupo espacial | P-3 ₂ |
| a, Å | 16.136(3) |
| b, Å | 16.136(3) |
| c, Å | 6.0688(10) |
| α | 90(2) |
| β | 90(2) |
| γ | 120(2) |
| V, Å³ | 1368.4(6) |
| Z | 3 |
| ρ_{calc}, mg.cm⁻³ | 1.130 |
| μ, mm⁻¹ | 0.998 |
| 2θ range for data | 2.524 – 26.381° |
| Index ranges | -20 ≤ h ≤ 20, -18 ≤ k ≤ 20, -6 ≤ l ≤ 7 |
| No. of reflns collected | 12540 |
| No. of indep reflns | 3479 |
| [R_{int}] | 0.0583 |
| Goodness of fit | 1.019 |
| R1, wR2 (I>2σ(I)) | 0.0583 0.0958 |
| R1, wR2 (all data) | 0.1085 0.1088 |

Tabla 5. Longitudes de enlaces de la molécula **L1** (Å).

| Átomos | Longitud de enlace |
|---------|--------------------|
| C6 - C7 | 1.453 (7) |
| C6 – N2 | 1.268 (9) |
| N2 – C3 | 1.426 (6) |
| C8 - O | 1.333 (9) |


Figura 15. Interacciones intramoleculares y representación de la no planalidad en **L1**.

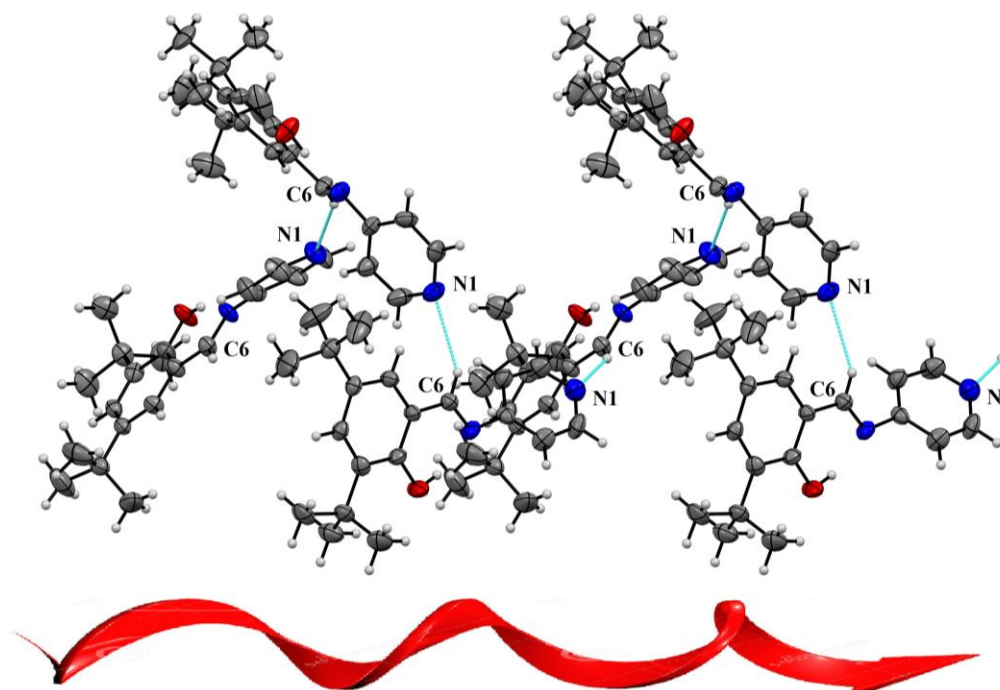
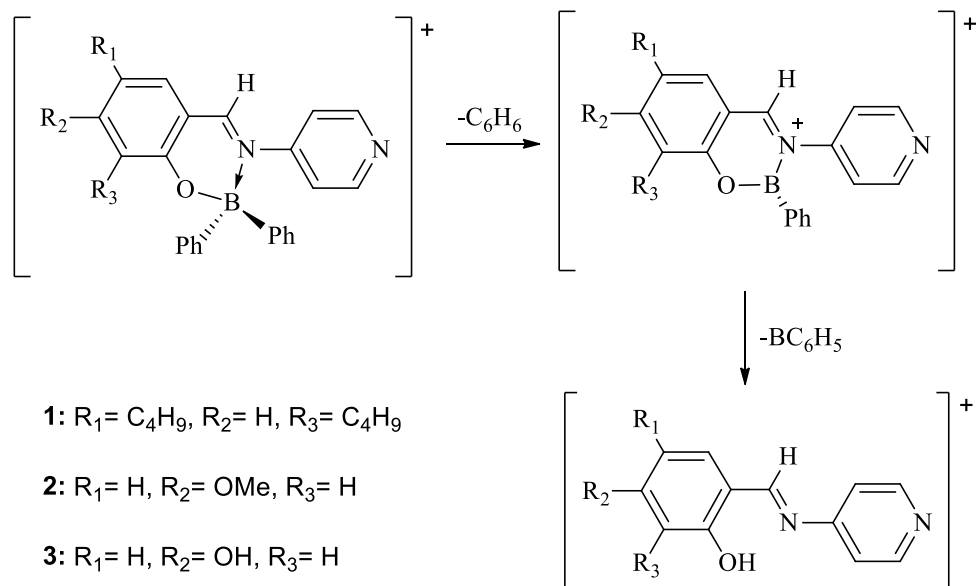


Figura 16. Interacciones intermoleculares para el ligante **L1** en forma de hélice.

5.1.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN (EMAR)

En el caso de la caracterización de los compuestos de boro por espectrometría de masas de alta resolución, donde el análisis de los espectros obtenidos por ionización química a presión atmosférica (APCI) en fase positiva; reveló la presencia de los iones moleculares de los tres compuestos, mostrando el mismo patrón de fragmentación; los cuales mostraron primero la fragmentación debido a la pérdida de masa correspondiente a los grupos fenilos unidos al átomo de boro, dando la estructura correspondiente a los ligantes en cada caso (Esquema 6). La presencia del pico base de los compuestos de boro son consistentes con la masa molecular teórica (**1**: 474.46; **2**: 393.17; **3**: 379.16) como se puede apreciar en la Tabla 6, ya que la masa encontrada mediante el análisis se encuentra protonadas confirmando la obtención de los compuestos de boro, con

pequeños errores en ppm. A manera de ejemplo se presenta el espectro de masas del compuesto **1** (Figura 17).



Esquema 6. Fragmentos moleculares para los compuestos de boro **1-3**.

Tabla 6. Datos de espectrometría de masas para los compuestos de boro en m/z.

| Compuesto | Masa Encontrada [M+H] | Masa teórica | Error (ppm) |
|-----------|-----------------------------|-----------------|----------------|
| 1 | 475.291656 | 474.46 | 0.2844 |
| 2 | 393.176837 | 392.17 | 0.1218 |
| 3 | 379.162601 | 378.15 | 0.6031 |



Figura 17. Espectro de masas de alta resolución para el compuesto **1**.

Además, para confirmar que se obtuvo el compuesto de boro se realizó una ampliación del ion molecular dentro de los espectros registrados para cada compuesto, en donde se compararon las distribuciones isotópicas teóricas y experimentales de los espectros, en donde se aprecia claramente el mismo patrón isotópico con el mismo valor de masa/carga, confirmando claramente la presencia de un átomo de boro (Figura 18). Cabe resaltar que la presencia de las cuatro señales del ion molecular corresponde a la distribución isotópica lo cual permite predecir la masa y la abundancia de los isótopos, en donde las abundancias se calculan al conocer la abundancia natural.

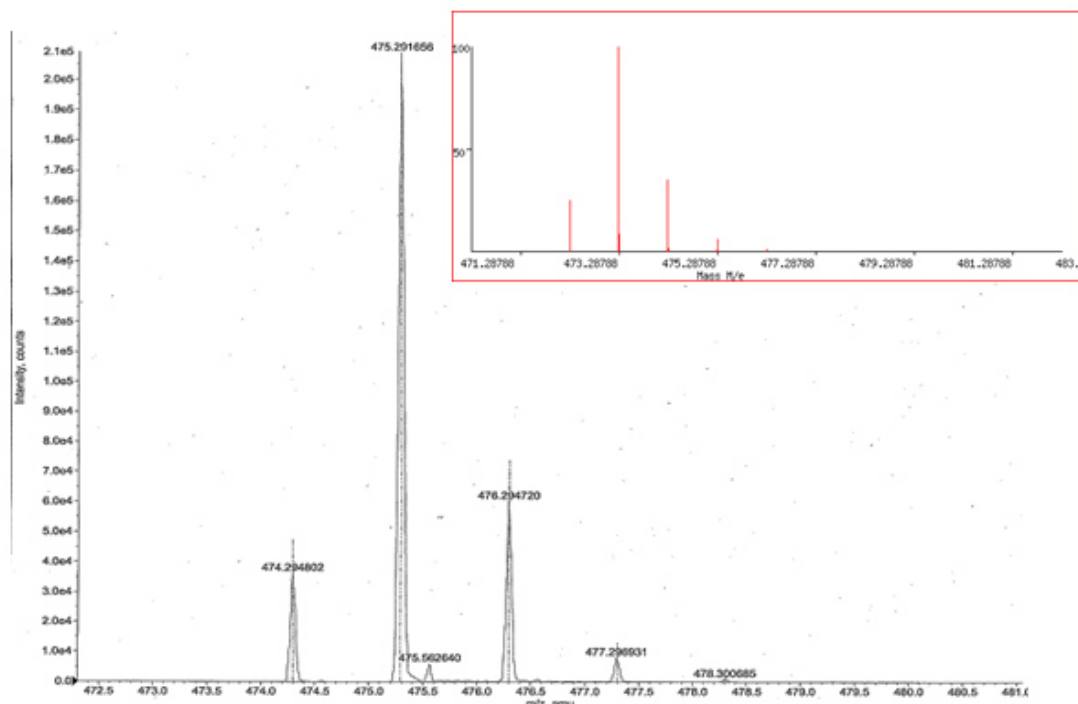


Figura 18. Comparación de distribuciones isotópicas teóricas/experimentales del compuesto **1**.

5.1.3. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Los espectros de RMN de ^1H , ^{13}C y ^{11}B para el compuesto de boro **1** fueron obtenidos en cloroformo deuterado (CDCl_3) en donde se pudo asignar todas las señales correspondientes a la molécula. Cabe mencionar que la resonancia magnética nuclear para los compuestos **2** y **3** no fue posible obtener debido a la inestabilidad de los compuestos en solución, lo cual se explica en el apartado **5.1.5**. Fotoestabilidad y estabilidad en medio acuoso.

En el espectro del compuesto **1** se observa una señal simple a 8.3 ppm correspondientes al protón imínico de acuerdo a lo ya reportado a la literatura, David A. Atwood *et. al.* reportan valores de del protón imínico de 7.99 a 8.81 ppm.⁵⁴ Por otra parte, se puede observar a frecuencias altas las señales correspondientes a los hidrógenos de los anillos aromáticos; en el área alifática se observan 2 señales simples correspondientes a los hidrógenos de los grupos terbutilos integrando para 9 hidrógenos cada señal (Figura 19).

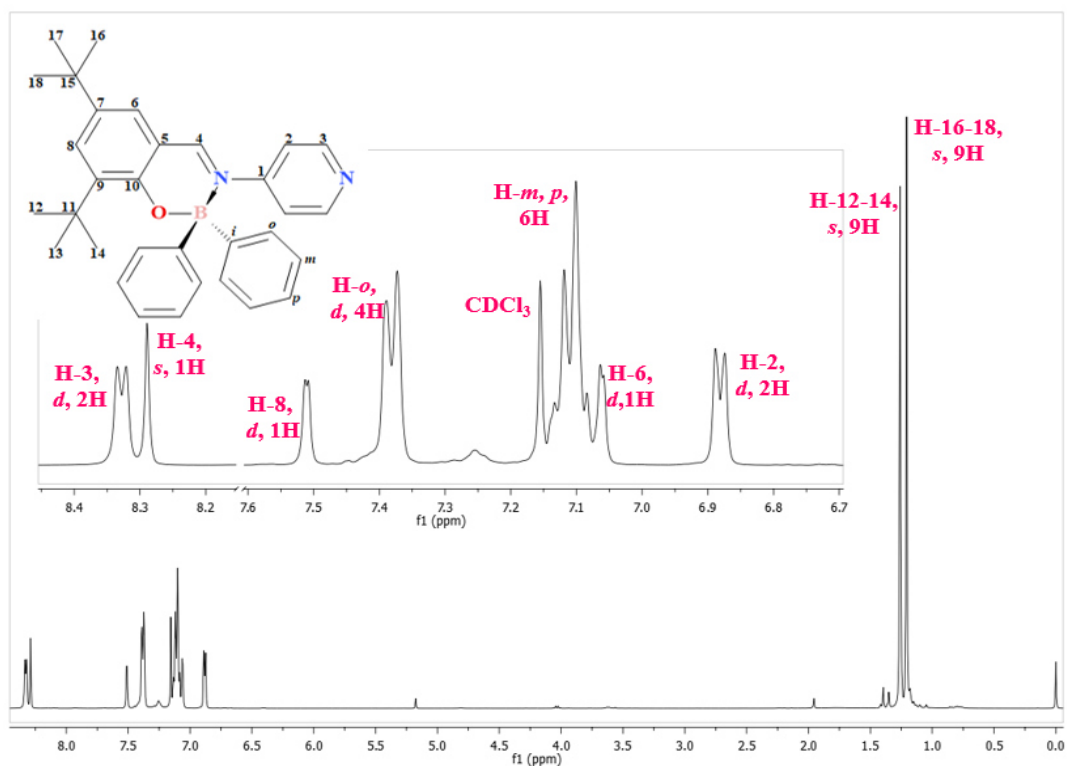


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H NMR (400 MHz, CHCl_3) para el compuesto **1**.

Dentro de los datos encontrados en el espectro de RMN de ^{13}C se observan todas a las señales correspondientes a los carbonos correspondientes a la estructura, mostrando principalmente la formación de la base de Schiff a 163 ppm, señal característica de la formación del enlace. A frecuencias altas se observar las señales de los carbonos aromáticos; así mismo se puede apreciar en el área alifática las señales correspondientes a los carbonos de los grupos terbutilos, comprobando la existencia del compuesto (Figura 20).

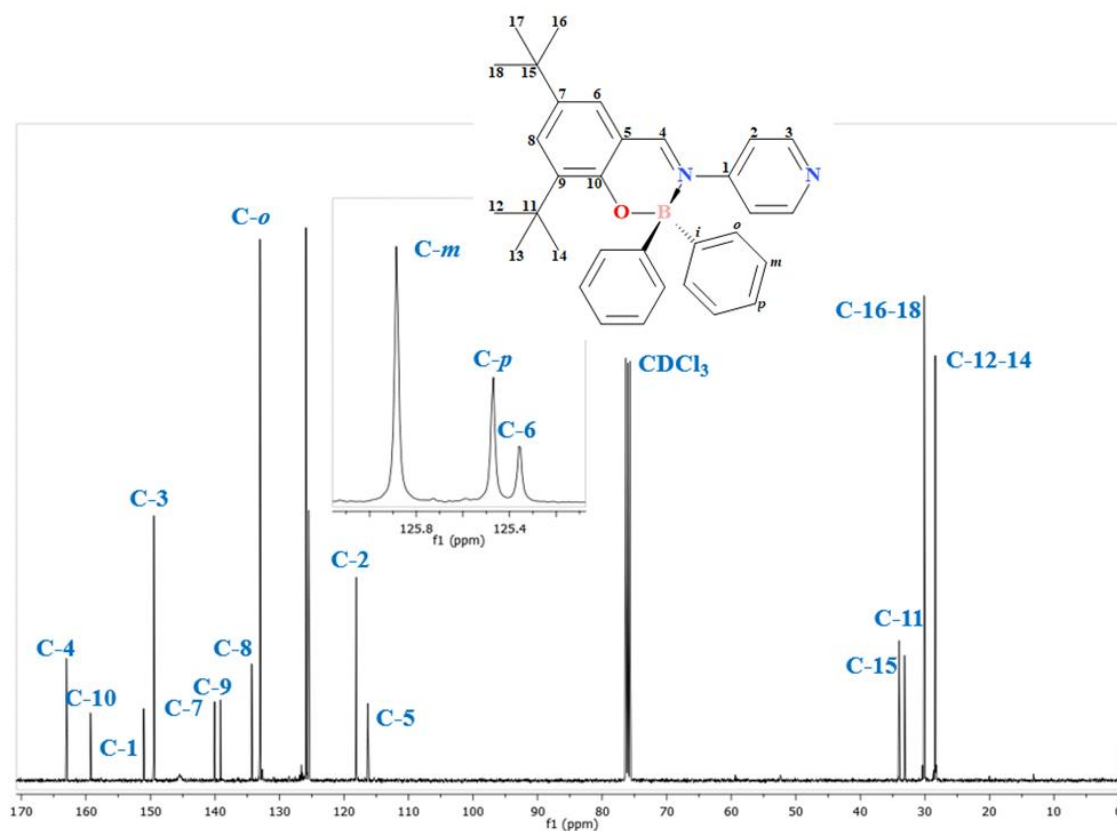


Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C NMR (100 MHz, CHCl_3) para el compuesto **1**.

A lo que corresponde al espectro de RMN de ^{11}B se observó una señal amplia a 6.89 ppm como se puede apreciar en la Figura 21, esto se debe a que el isótopo ^{11}B tiene un spin $3/2$ y presenta un bajo momento cuadrupolar con lenta relajación,⁵⁵ lo cual de acuerdo a la literatura corresponde a la obtención de un átomo de boro tetracoordinado, confirmando la existencia del compuesto de boro.⁴⁹

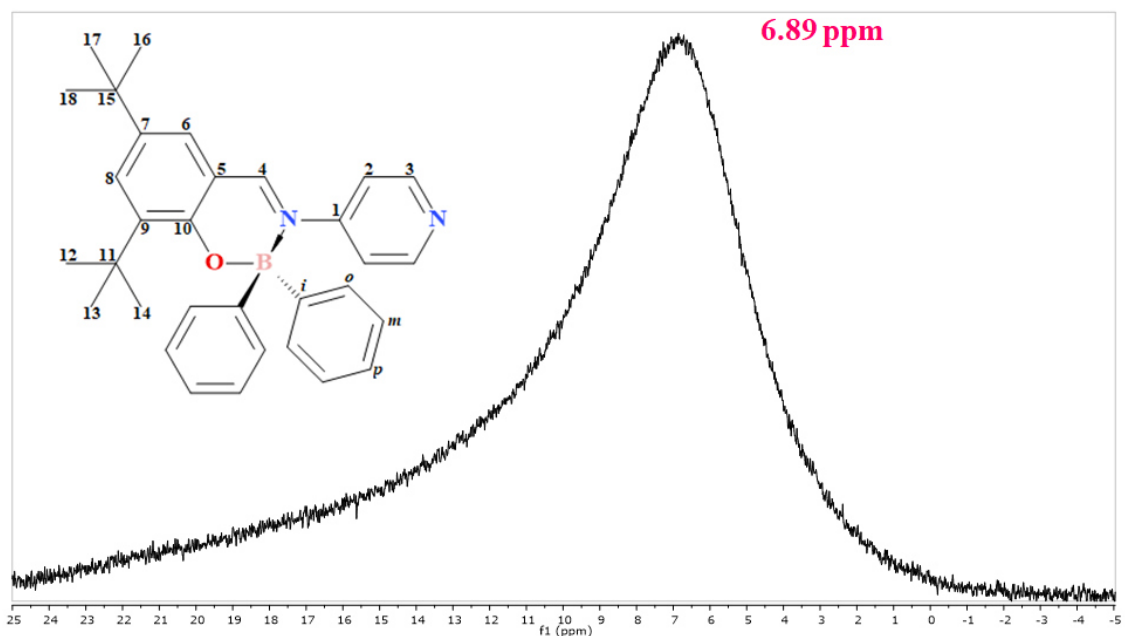


Figura 21. Espectro de RMN de ^{11}B para el compuesto 1.

5.1.4. PROPIEDADES ÓPTICAS

Las propiedades fotofísicas de los compuestos de boro se investigaron en acetonitrilo grado espectroscópico de Aldrich a temperatura ambiente. Los datos se recopilan en la Tabla 7. Los espectros de absorción UV-Vis (Figura 22) muestran picos debido a las transiciones electrónicas, que se encuentra entre 389 a 424 nm según la conjugación de la molécula. En los espectros de fluorescencia (Figura 22) los picos de emisión se desplazan hacia el rojo de 510 a 573 nm, debido a la pérdida de energía cuando sucede la conversión interna del estado excitado, con la misma tendencia observada en UV-Vis.

Posteriormente se determinó el cálculo de rendimiento cuántico de fluorescencia en solución (ϕ) los cuales se determinaron con absorbancia menores a 0.1 a una longitud de excitación de 10 nm abajo del pico de absorción de mayor longitud de onda. Se analizaron tres diferentes soluciones para cada compuesto y se promedió estadísticamente el valor del rendimiento cuántico, tomando en cuenta el área bajo a curva de los espectros de emisión, su absorbancia y los índices de refracción de la muestra y del estándar. Utilizando como estándar el sulfato de quinina en H_2SO_4 0.1M ($\phi = 0.54$ a 310 nm). Los resultados obtenidos del rendimiento cuántico de los compuestos de boro fueron de 9.27% para el compuesto **1**, 16.22% para el compuesto **2** y para el compuesto **3** obtuvo 10.36%. Estos resultados fueron mejores a lo previamente obtenido en el grupo de investigación (<1%), estos resultados se pueden deber a que el átomo de boro se encuentra en un acomodo coplanar con respecto al ligante. Por otra parte, se observa un comportamiento similar para el compuesto **2** y **3** debido a la similitud estructural; sin embargo, existe una diferencia en el rendimiento cuántico; esto es debido a que tienen un sustituyente donador diferente (**2**: OMe y **3**: OH) en el cual tanto en oxígeno como el grupo metilo proporcionan mayor densidad electrónica presentando así un mejor rendimiento para el compuesto **2**. Además, tiene el menor cambio de Stoke (5967.60 cm^{-1}) lo cual comprueba el rendimiento cuántico de fluorescencia más alto de la serie de los tres compuestos.

Tabla 7. Datos de las propiedades fotofísicas de los compuestos de boro en solución (ACN).

| Comp. | λ_{abs} | λ_{em} | $\Delta\nu$ | Φ |
|-------|------------------------|-----------------------|---------------------|--------|
| | [nm] | [nm] | [cm ⁻¹] | (%) |
| 1 | 305, 426 | 573 | 6022.17 | 9.27 |
| 2 | 315, 391 | 510 | 5967.60 | 16.22 |
| 3 | 315, 389 | 510 | 6099.10 | 10.36 |

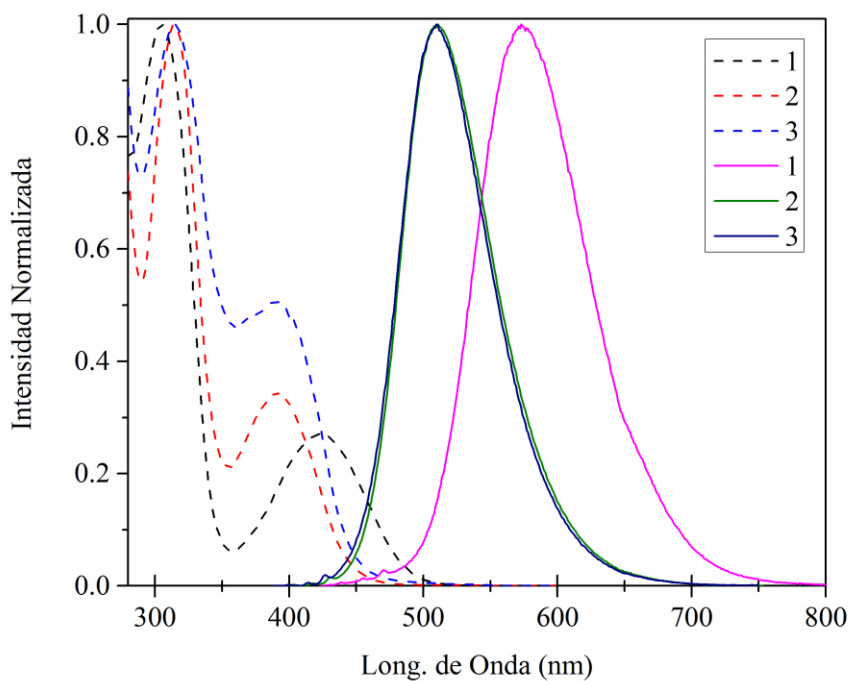


Figura 22. Espectros de absorción (línea punteada) y emisión (línea sólida) de los compuestos de boro.

5.1.5. FOTOESTABILIDAD Y ESTABILIDAD EN MEDIO ACUOSO

Para toda nueva molécula sintetizada es de gran importancia conocer su fotoestabilidad, para sus posibles aplicaciones. Es por ello, que se realizó dicho estudio para los nuevos compuestos de boro. Tomando como 100% el valor de la intensidad de absorción de la medición inicial (T_0), se correlacionó la disminución de absorbancia de las siguientes mediciones como el porcentaje de compuesto fotodegradado. Se puede apreciar en la Figura 23 que los compuestos 2 y 3 sufren una drástica fotodegradación desde los primeros 15 min, disminuyendo su intensidad de absorción hasta alcanzar valores de 28.0 y 24.2%, respectivamente. Sin embargo, el compuesto 1 presenta una resistencia a la fotodegradación, ya que solo disminuye el 35.2% de la absorbancia, manteniéndose casi en equilibrio hasta completar 60 minutos de ser irradiado con luz UV. Por otro lado, en el ensayo de estabilidad en medio acuoso se observa una degradación menor, ya que en general los compuestos mantienen valores superiores del 85% de la intensidad de absorbancia inicial transcurrido los 60 minutos (Figura 24). Cabe mencionar que el compuesto 1 mostró una degradación más lenta en comparación de los compuestos 2 y 3. Podría atribuirse que los voluminosos grupos terbutilo del compuesto 1 le otorgan mayor resistencia a la degradación, ya sea al ser irradiado con luz UV y al estar en medio acuoso, lo cual es comparable a lo ya reportado.⁵⁶

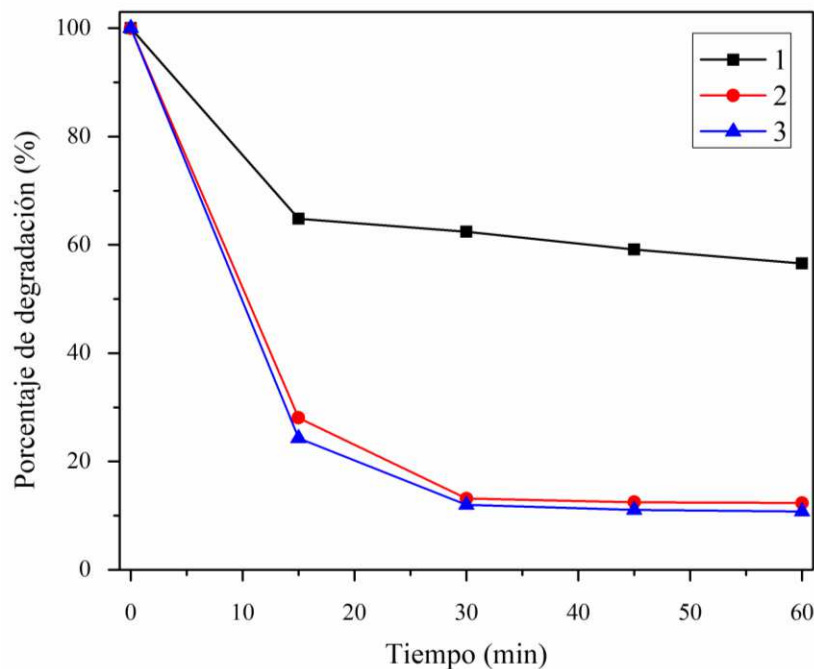


Figura 23. Fotoestabilidad de los compuestos de boro **1-3** en acetonitrilo bajo una irradiación de una lámpara UV de 321 nm.

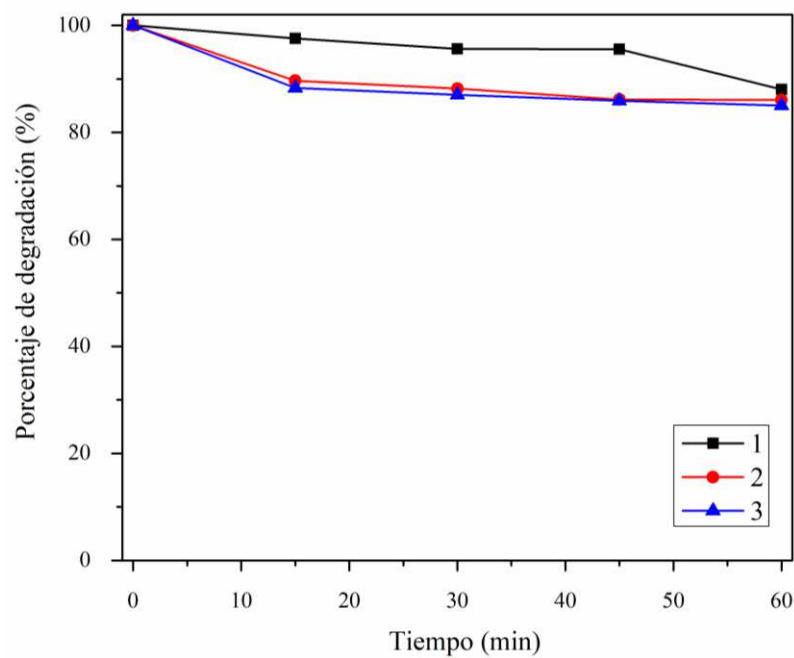


Figura 24. Fotoestabilidad de los compuestos de boro **1-3** en solución acuosa.

5.1.6. ANÁLISIS CITOTÓXICO DE LOS COMPUESTOS DE BORO

La actividad de citotoxicidad *in vitro* de los tres compuestos de boro se evaluó mediante la técnica de azul alamar a diferentes concentraciones 0.1 a 10 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 25) por 24h con células de melanoma murino B16F10. Los resultados reflejan que el compuesto **1** presenta una viabilidad alrededor del 80% hasta 5 $\mu\text{g/mL}$, mientras que los compuestos **2** y **3** resultan ser inocuos para las células hasta una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ con valores de viabilidad mayores a 74%, lo cual comparado con la literatura este tipo de compuestos de boro presentan viabilidades altas $>90\%$,⁵⁷ cabe mencionar que para el compuesto **2** y **3** presentaron viabilidades arriba del 100% debido a que las células siguen siendo estables y se reproducen, mostrando así que los compuestos de boro son candidatos idóneos para ser utilizados en aplicaciones médicas.

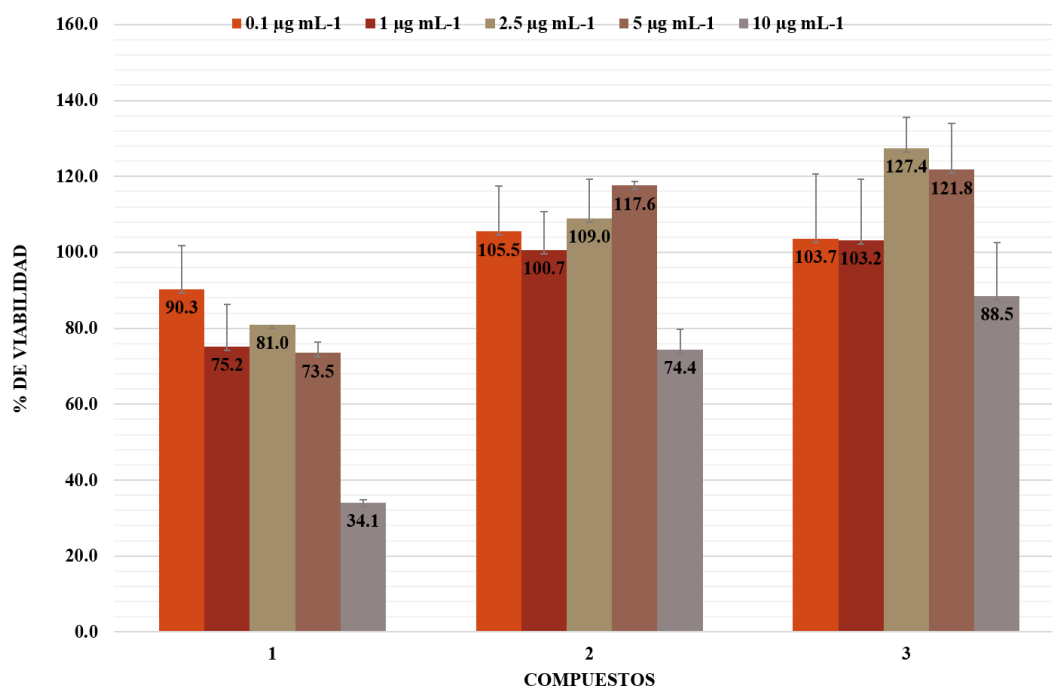


Figura 25. Efecto citotóxico de los compuestos de boro. Células de melanoma B16F10 fueron tratadas a concentraciones de 0.1 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por 24 h.

5.1.7. COMPÓSITOS SF/B/HA

Para la obtención de los compósitos de fibroína de seda/compuestos de boro/hidroxiapatita (SF/B/HA) Figura 26, se realizó una mezcla de 2 mL de la solución acuosa de fibroína de seda con la hidroxiapatita según la concentración deseada en 2 mL de agua destilada durante 5 minutos en ultrasonido para una mejor dispersión de la hidroxiapatita. Posteriormente, se hizo la adición del compuesto de boro 1 a 0.1% (p/p) ya que este compuesto presentó mejor estabilidad en medio acuoso y presenta buena viabilidad celular, permitiendo su uso para una potencial aplicación médica. La solución se dejó homogenizar por 5 minutos, para después ser colocado en moldes de 2 cm de diámetro, por último, las muestras fueron liofilizadas durante 48 h; ya que esta técnica es una de las más utilizadas para la obtención de materiales porosos.⁵⁸ Teniendo como resultado estructuras en forma de esponja.

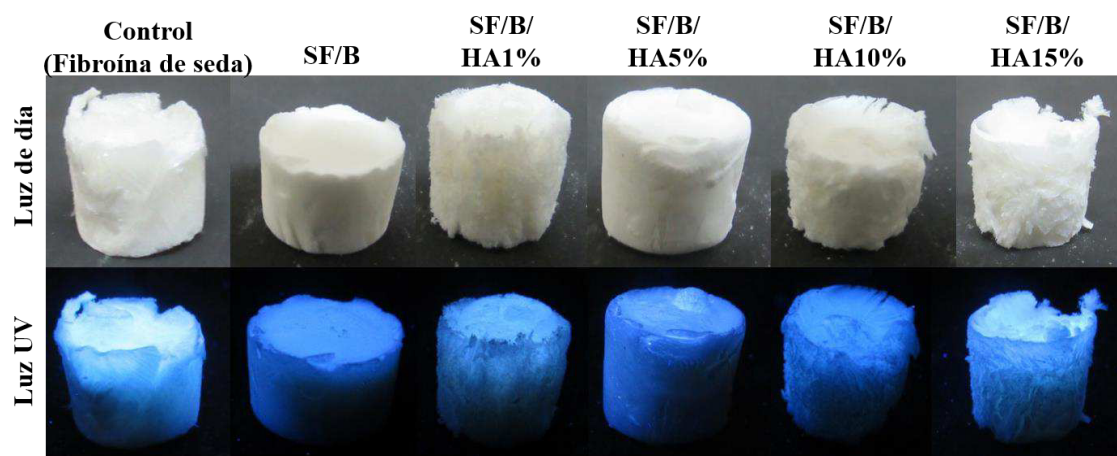


Figura 26. Compósitos fibroína de seda/boro/hidroxiapatita

5.1.8. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Las imágenes de SEM de los compósitos SF/B/HA se muestran en la Figura 27. La Figura 27A y 27B corresponden a los biomateriales de fibroína de seda (control) y fibroína de seda con compuesto de boro respectivamente a 200X; en donde se puede apreciar la morfología de los materiales en una estructura laminar; mientras que en las Figuras 27C - 27F (1, 5, 10 Y 15% de HA respectivamente), muestran una estructura porosa; correspondientes a los materiales con HA, mostrando así que este material cerámico permite obtener compósitos porosos; lo cual es de suma importancia ya que permite el crecimiento celular, lo cual es la clave para el éxito de cualquier andamio.

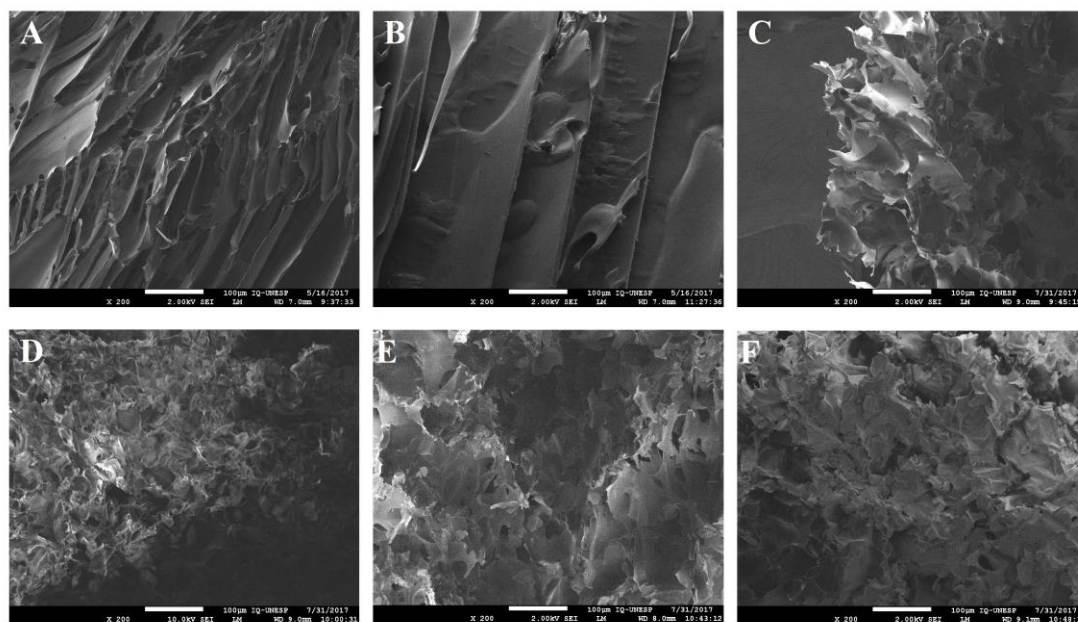


Figura 27. Micrografía SEM de los biomateriales a resolución de 200X.

Por otra parte, se pudo observar la presencia de HA, mediante un análisis de espectroscopía de energía dispersiva (EDS) Figura 28 en donde se detectaron las señales correspondientes a la presencia de calcio y fósforo confirmado la presencia del material cerámico (HA); sin embargo, solo se pudo observar para las muestras de 10 y 15% de HA, ya que para las muestras de 1 y 5% de HA contienen una menor concentración, de igual manera para la señal correspondiente al boro por su baja concentración adicionada al biomaterial, lo cual no permite ser observadas dichas señales.

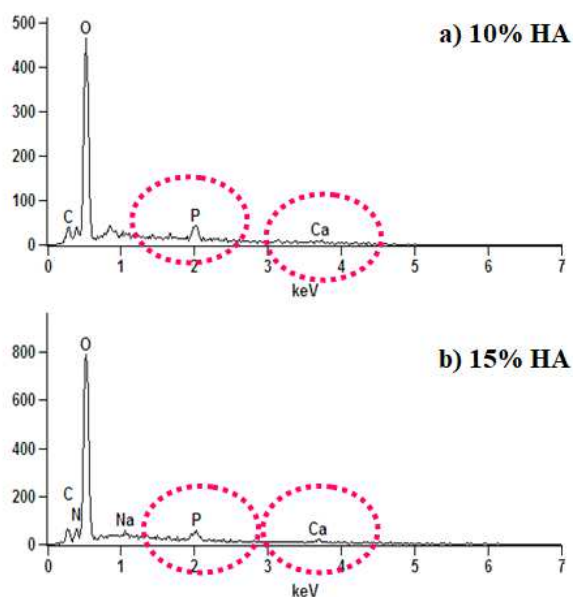


Figura 28. Espectro de EDS: a) SF/B/HA10% y b) SF/B/HA15%.

5.1.9. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

Los espectros FT-IR de los compósitos se muestran en la Figura 29. Se observaron frecuencias vibratorias características de la fibroína de seda para todos los compósitos asignados, mostrando señales características de los grupos de amida de la proteína. Los picos a ~ 1641 y 1514 cm^{-1} se asignaron a amida I (C=O estiramiento) y amida II (N-H flexión) respectivamente. Estas bandas corresponden a la estructura de la fibroína. Además, la hidroxiapatita en polvo muestra bandas características asignadas al grupo fosfato a 1025 y 961 cm^{-1} , pero los compósitos de fibroína de seda no se ven afectados estructuralmente por la incorporación de hidroxiapatita comprobando que no hay modificación estructural de la proteína.

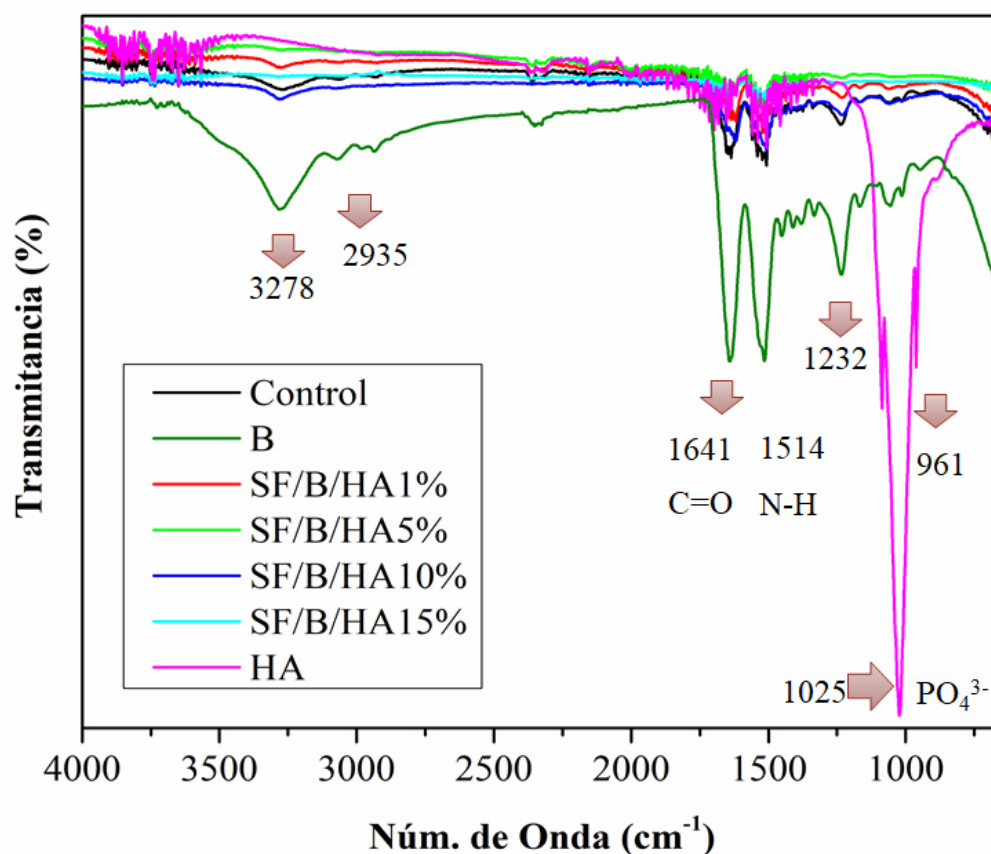


Figura 29. Espectro infrarrojo de los biomateriales y de la HA.

5.1.10. DIFRACCIÓN DE RAYOS X EN POLVO

La Figura 30 se muestra el difractograma en donde se puede apreciar los patrones de difracción de rayos X típicos de un biomaterial de fibroína de seda con una señal amorfa en forma de campana amplia de aproximadamente 20° (línea negra), lo que se atribuye a la forma de la hoja- β de la proteína y su baja cristalinidad, de acuerdo a lo ya reportado en la literatura.⁵⁹ La presencia de HA en los compósitos se puede observar picos de baja intensidad y un ensanchamiento de los picos correspondientes a la HA (111), (002), (211), (112) y (300),⁶⁰ lo cual se atribuye a la disminución de la cristalinidad de la HA; sin embargo, se puede apreciar de mejor manera como es el caso del compósito con 15% de HA comprobando la existencia del material cerámico.

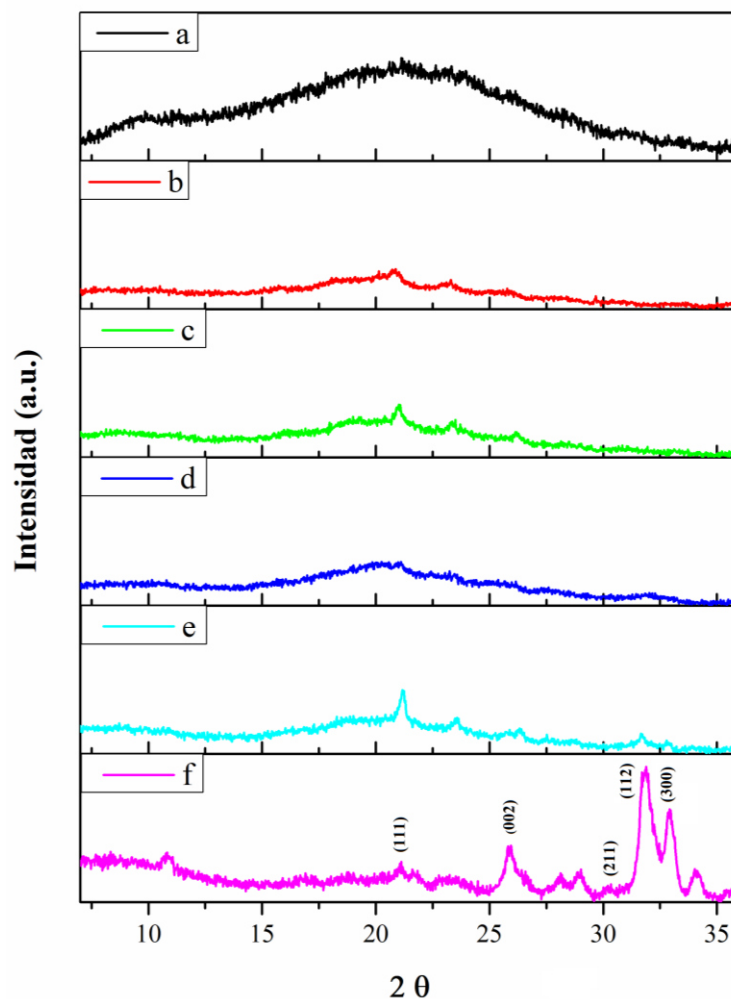


Figura 30. Difractograma XDR de los compósitos a) Control, b) B, c) SF/B/HA1%, d) SF/B/HA5%, e) SF/B/HA10% y f) SF/B/HA15%.

5.1.11. CAPACIDAD DE ABSORCIÓN

La capacidad de absorción de agua es de gran importancia para poder comprobar si el material tiene la propiedad de difundir el agua o medios fisiológicos (PBS), ya que la difusión del agua permite el transporte de los nutrientes y ayuda al crecimiento de nuevas células. Los resultados de la capacidad de absorción obtenidos de los compuestos muestran el equilibrio después de 250 minutos de análisis. Las muestras SF/B/HA5, SF/B/HA10 y SF/B/HA15 alcanzan el mayor volumen de capacidad de absorción hasta 1200% debido a la gran porosidad obtenida atribuida a la alta concentración de HA en los compósitos, esto puede verificarse con las imágenes de SEM (*vide supra*); resultando materiales prometedores para el crecimiento celular en comparación a lo ya reportado, cuyos materiales presentan poca absorción y por lo tanto escaso crecimiento celular⁶¹.

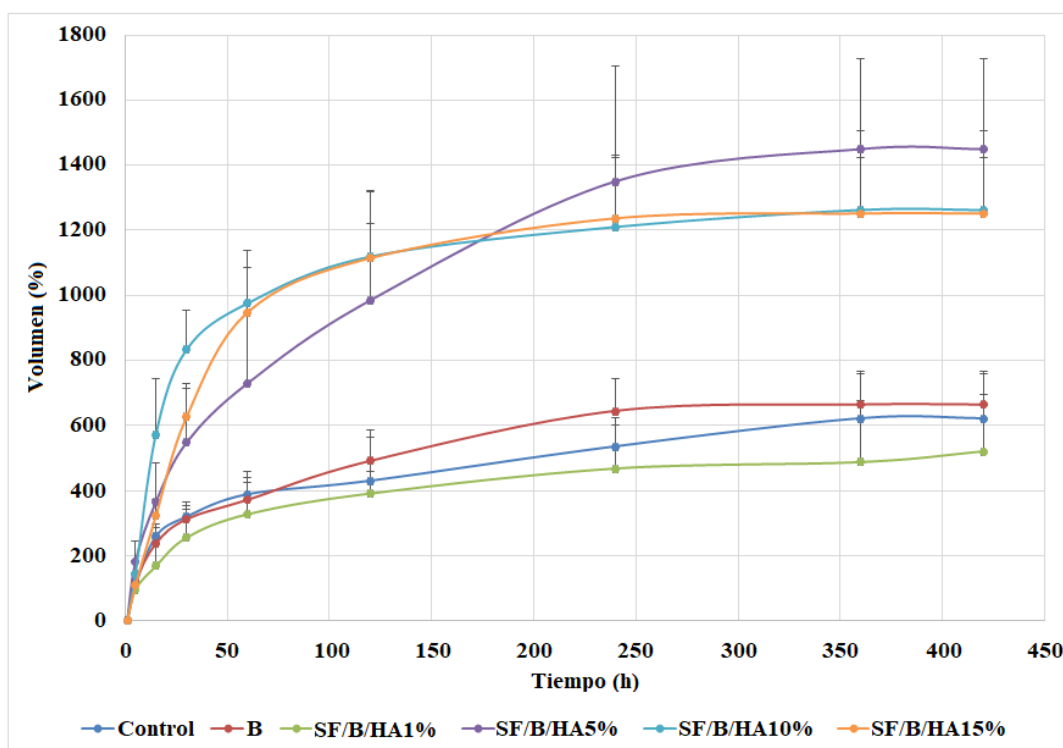


Figura 31. Capacidad de absorción de los biomateriales en PBS a pH 7.4 a diferentes tiempos, expresado en porcentaje.

5.1.12. CITOTOXICIDAD DE LOS BIOMATERIALES

La actividad de citotoxicidad *in vitro* para los 6 biomateriales se determinó mediante el ensayo MTT, se evaluó con células GM07492 (fibroblasto humano) (10 $\mu\text{g/mL}$) durante 24h en una atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de aire. La viabilidad celular muestra menor toxicidad para todos los compósitos, en comparación de los compuestos derivados de bases de Schiff anteriormente utilizados en seda.⁶² Además, la viabilidad celular aumenta en función de la concentración de HA, sugiriendo que estos biomateriales son prometedores para aplicaciones médicas (Figura 32).

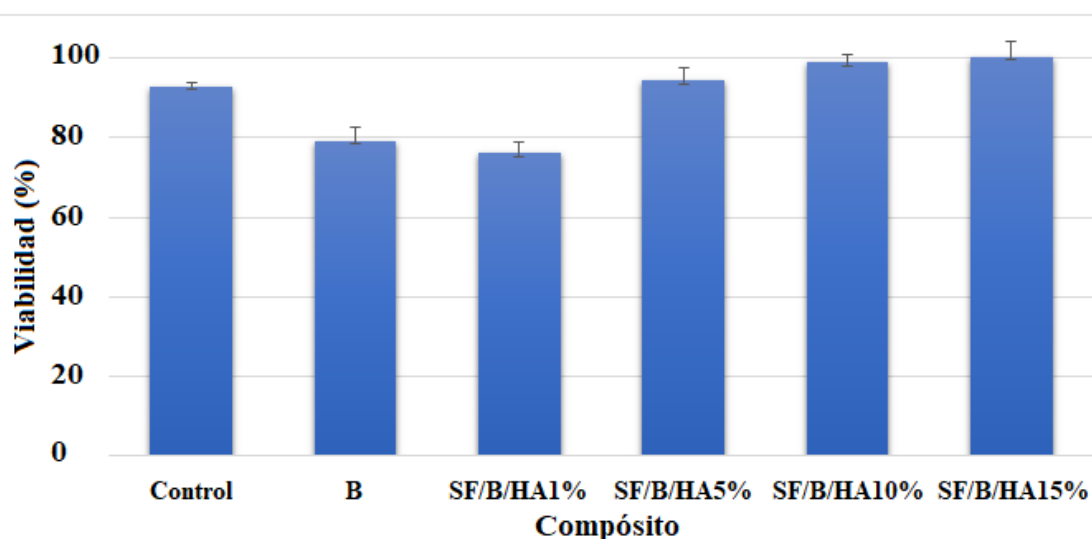


Figura 32. Viabilidad celular (método MTT) de los biomateriales en células GM07492 durante 24h.

5.1.13. MICROSCOPIA POR FLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL

Referente a la microscopia de fluorescencia se pudo observar que los biomateriales con compuesto de boro presentan el fenómeno de la luminiscencia (Figura 33). Sin embargo, al tener materiales tridimensionales no se pudo tener una buena calidad de imagen. Por lo cual se evaluaron los biomateriales por microscopia confocal en donde se puede apreciar una mejor resolución de los materiales, mostrando uniformidad del compuesto luminiscente en los biomateriales (Figura 34).

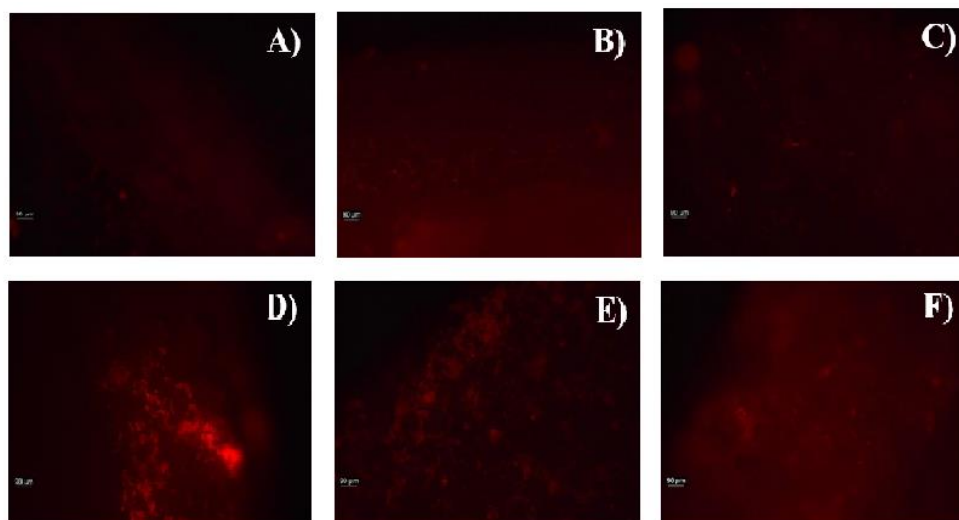


Figura 33. Imágenes de microscopia de fluorescencia de los biomateriales A) Control, B) SF/B, C) SF/B/HA1%, D) SF/B/HA5%, E) SF/B/HA10%, y F) SF/B/HA15%.

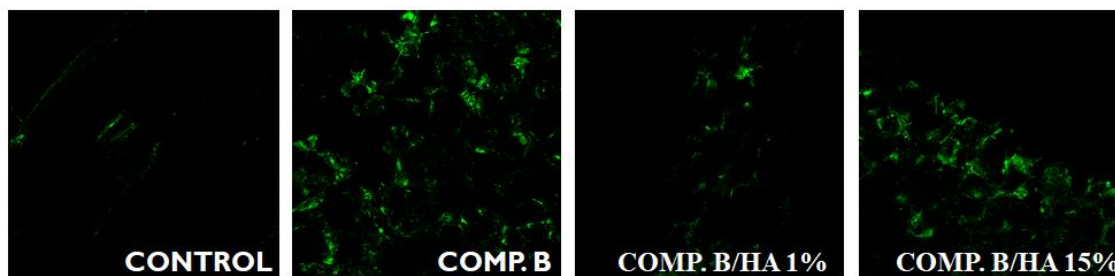


Figura 34. Imágenes por microscopia confocal de los biomateriales.

5.1.14. EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN POR SEM

En las micrografías obtenidas por SEM se aprecia que los materiales después de ser sometidos a degradación muestran desgastes por erosión en la superficie como se representa en la Figura 35. Esto se observa de manera más significativa para los materiales control (fibroína de seda), caso contrario para los materiales con compuesto de boro y con 10% de HA, los cuales mostraron ser más resistentes a la degradación, lo cual permite que estos materiales tengan mayor tiempo de vida y pueden ser utilizados en diversas aplicaciones médicas.

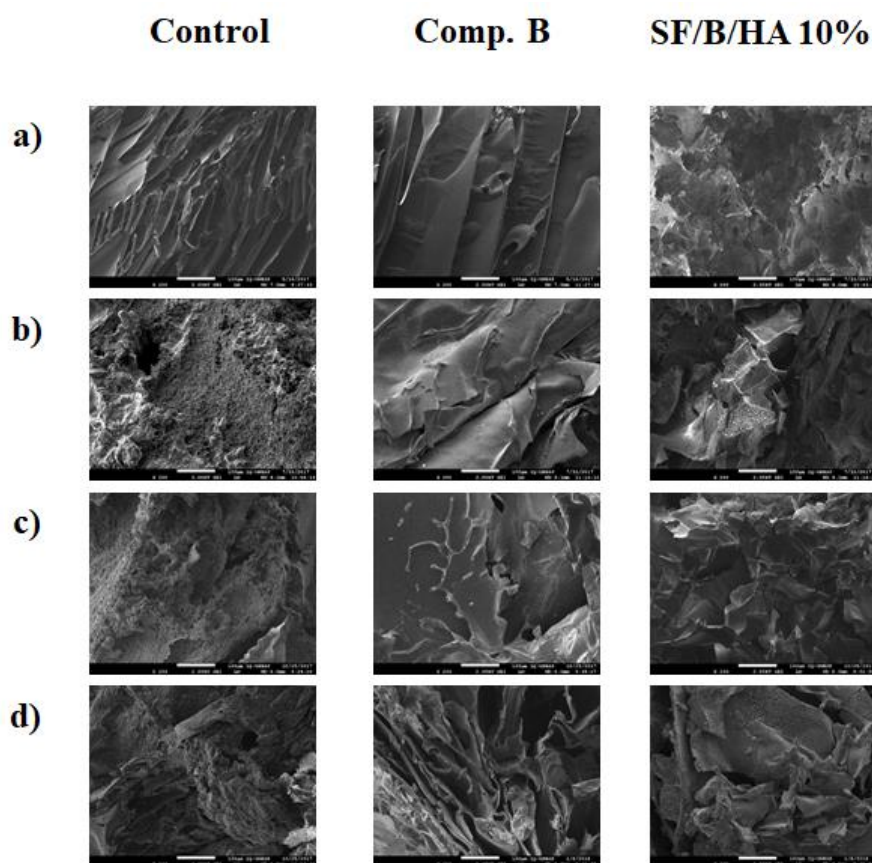


Figura 35. Imágenes de SEM de la degradación de los compósitos a 200x; a) sin tratamiento, b) 1 semana, c) 3 semanas y d) 6 semanas.

5.1.15. ESPECTROSCOPIA DE IR DE LA DEGRADACIÓN

Posteriormente a la degradación de los biomateriales, se le realizó un análisis cualitativo mediante espectroscopía infrarrojo, en donde los espectros (Figura 36) para los materiales degradados a diferentes tiempos (1, 3 y 6 semanas), se puede apreciar que no presentaron modificación o cambio estructural después de ser sometidos a la degradación, los cuales mostraron estabilidad estructural hasta un tiempo de 6 semanas.

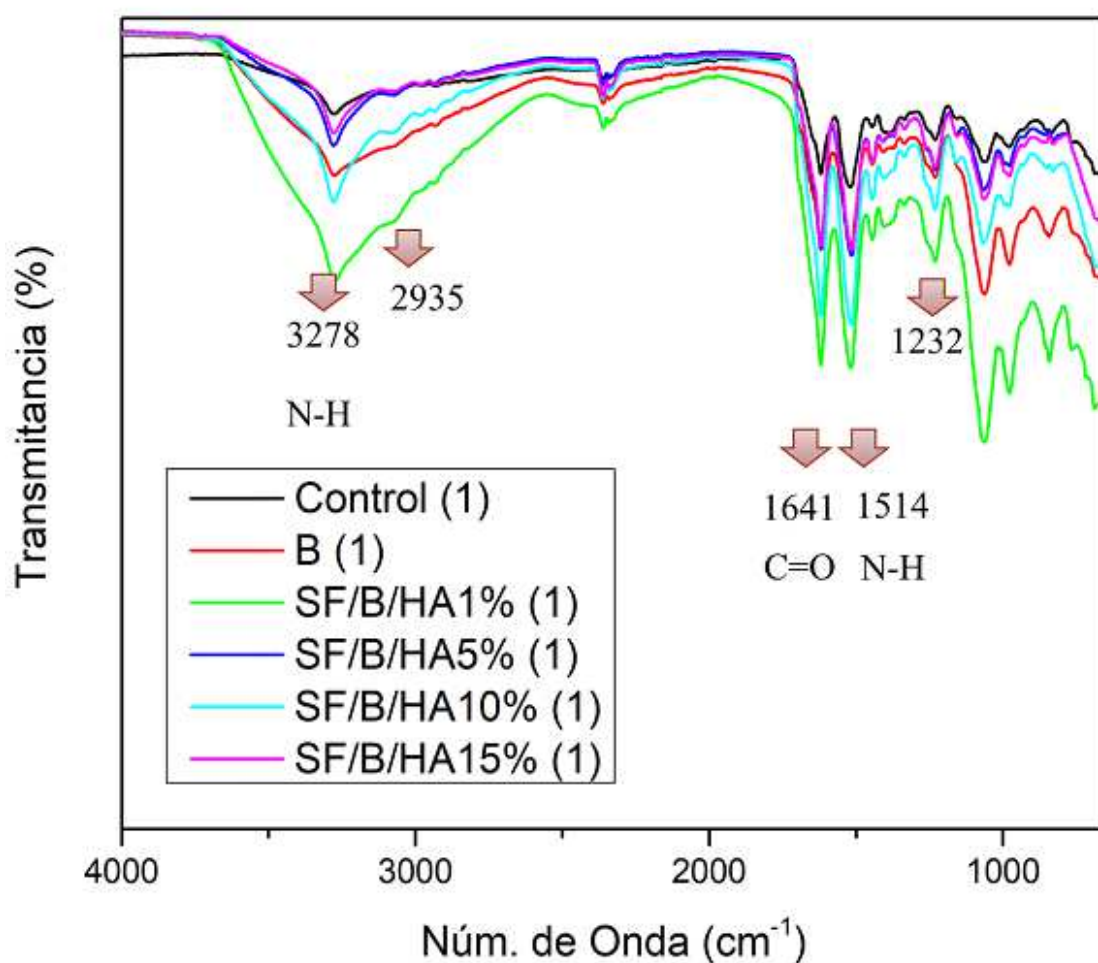


Figura 36. Espectro infrarrojo de los biomateriales después de 1 semana de degradación.

CAPÍTULO

6. CONCLUSIONES

Se sintetizaron tres nuevos compuestos luminiscentes de boro derivados de bases de Schiff, en donde por medio de síntesis por microondas se redujeron hasta 96 veces el tiempo de reacción en comparación de la síntesis por método tradicional, sin afectar el rendimiento de reacción ya que también se obtuvieron valores más altos. Además, estos materiales luminiscentes se sintetizaron de forma más eficiente que los materiales luminiscentes empleados con aplicaciones médicas, por ejemplo, derivados de la rodamina y compuestos tipo BODIPY.

Se logró caracterizar el compuesto **1** por RMN (^1H , ^{13}C y ^{11}B) en donde se pudo comprobar la formación de la base de Schiff, además se asignaron todas las señales inequívocamente con ayuda de los espectros COSY y HSQC.

Fue posible establecer los valores del rendimiento cuántico de los compuestos de boro (Φ 9.27, 16.22 y 10.36 %) en donde se observó que la presencia de grupos electrodonadores $-\text{OH}$ y $-\text{OMe}$ en los compuestos **2** y **3** respectivamente, aumentan considerablemente los valores de rendimiento cuántico, en comparación del compuesto **1**, el cual no presenta grupos que sean donadores de electrones.

El compuesto **1** presentó mayor resistencia a la fotodegradación y mejor estabilidad en medio acuoso, respecto a los compuestos **2** y **3**, atribuyéndole esta característica a la presencia de grupos voluminosos ter-butilos.

Las pruebas de citotoxicidad reflejaron que, en general, los compuestos de boro resultan ser inocuos en células de melanoma murino (B10F16) con una viabilidad mayor del 80% hasta una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$, siendo de suma importancia para su potencial aplicación médica.

En cuanto a la fabricación del biomaterial, se logró obtener los biomateriales de fibroína de seda con diferentes concentraciones de hidroxiapatita (1, 5, 10 y 15%) y la adición del compuesto **1** (0.1% p/p).

Los materiales obtenidos presentaron morfología porosa a la adición de la hidroxiapatita. Además, mediante rayos X e infrarrojo se comprobó que la incorporación de la hidroxiapatita y el compuesto de boro no presentan modificaciones químicas de la fibroína de seda.

Mediante la microscopia de fluorescencia y la microscopia confocal se observó la uniformidad del compuesto de boro en los compósitos, los cuales presentaron el fenómeno de la luminiscencia de manera uniforme.

Conforme al incremento de la concentración de hidroxiapatita en los biomateriales, aumentó gradualmente la estabilidad térmica y la viabilidad celular, esto último comprueba que los materiales son candidatos idóneos para ser utilizados en aplicaciones médicas, además de presentar la capacidad de absorción para ser un buen soporte para crecimiento celular.

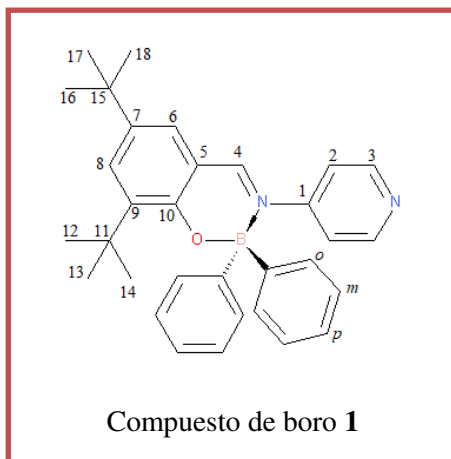
En cuanto a la degradación de los materiales, se llevó a cabo en diferentes tiempos en donde se ha podido comprobar hasta el momento mediante SEM que los biomateriales se degradan por erosión en la superficie, además de ser más estables los materiales con compuesto de boro e hidroxiapatita.

CAPÍTULO

7. SECCIÓN EXPERIMENTAL DETALLADA

7.1. Síntesis del compuesto de boro 1

Una solución de 3,5-di-ter-butil-2-hidroxibenzaldehído (1.0 mmol), 4-aminipiridina (1.0 mmol) y ácido difenilborónico (1.0 mmol) en 5 mL de acetonitrilo, fue irradiada por 30 min a 165 °C en un reactor de microondas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. El precipitado fue filtrado y lavado con hexano. Se obtuvo un sólido color rojo con rendimiento de 95%. P.F. 78-80 °C. UV/Vis (ACN): $\lambda_{\text{abs/max}}$: 426

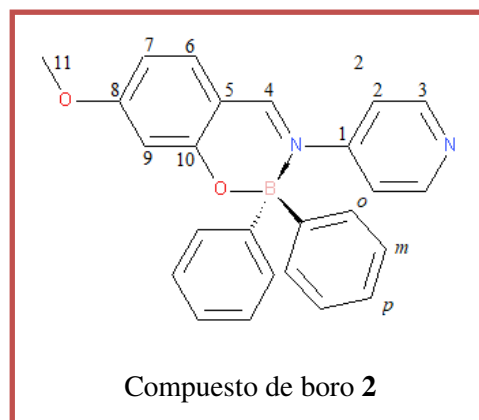


nm. Fluorescencia (ACN): λ_{fluor} : 573 nm. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.21 (s, 9H, H-16, H-17, H-18), 1.26 (s, 9H, H-12, H-13, H-14), 6.89 (d, 2H, $J=6.0$ Hz, H-2, H-2'), 7.06 (d, 1H, $J=2.0$ Hz, H-6), 7.12 (m, 6H, H-*m*, H-*p*), 7.39 (d, 4H, $J=6.4$ Hz, H-*o*), 7.51 (d, 1H, $J=2.0$ Hz, H-8), 8.29 (s, 1H, H-4), 8.33 (d, 2H, $J=5.2$ Hz, H-3, H-3') ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (100 MHz, CHCl_3) δ : 28.40 (C-16, C-17, C-18), 30.09 (C-12, C-13, C-14), 33.14 (C-11), 34.01 (C-15), 116.32 (C-5), 118.10 (C-2, C-2'), 125.36 (C-6), 125.47 (C-*p*), 125.88 (C-*m*), 132.99 (C-*o*), 134.28 (C-8), 139.17 (C-9), 140.04 (C-7), 149.43 (C-3, C-3'), 151.03 (C-1), 159.26 (C-10), 162.98 (C-4) ppm. Correlación COSY [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{H}}$]: 7.12/7.39 (H-*m*, H-*p*/H-*o*), 7.06/7.51 (H-6/H-8), 6.89/8.33 (H-2, H-2'/H-3, H-3'). Correlación HSQC [$\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$]: 1.21/28.40 (H-16, H-17, H-18/C-16, C-17, C-18), 1.26/30.09 (H-12, H-13, H-14/C-12, C-13, C-14), 6.89/118.10 (H-2, H-2'/C-2, C-2'), 7.06/125.36 (H-6, C-6), 7.12/125.47 y 125.88 (H-*p*, H-*m*/C-*p*, C-*m*), 7.39/132.99 (H-*o*/C-*o*), 7.51/134.28 (H-8/C-8), 8.29/162.98 (H-4/C-4), 8.33/149.43 (H-3, H-3'/C-3, C-3'). ^{11}B NMR (128 MHz, CDCl_3) δ : 6.89 ppm. HRMS m/z (%): $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{ON}_2\text{B}$: Teórico: 474.46, encontrado: 475.291656, (error: 0.284422 ppm).

7.2. Síntesis del compuesto de boro 2

Una solución de 2-hidroxi-4-metoxibenzaldehído (1.0 mmol), 4-aminipiridina (1.0 mmol) y ácido difenilborónico (1.0 mmol) en 5 mL de acetonitrilo, fue irradiada por 30 min a 165 °C en un reactor de microondas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. El precipitado fue filtrado y lavado con hexano. Se obtuvo un sólido color amarillo con rendimiento

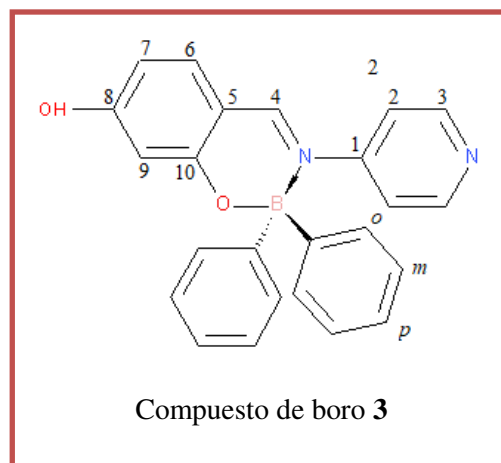
de 87%. P.F. 98-100 °C. UV/Vis (ACN): $\lambda_{\text{abs/max}}$: 391 nm. Fluorescencia (ACN): λ_{fluor} : 510 nm. HRMS m/z (%): $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{O}_2\text{N}_2\text{B}$: Teórico: 392.17, encontrado: 393.176837, (error: 0.121817 ppm).



7.3. Síntesis del compuesto de boro 3

Una solución de 2,4-dihidroxibenzaldehído (1.0 mmol), 4-aminipiridina (1.0 mmol) y ácido difenilborónico (1.0 mmol) en 5 mL de acetonitrilo, fue irradiada por 30 min a 165 °C en un reactor de microondas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. El precipitado fue filtrado y lavado con hexano. Se obtuvo un sólido color rojo con rendimiento

de 83%. P.F. 126-128 °C. UV/Vis (ACN): $\lambda_{\text{abs/max}}$: 389 nm. Fluorescencia (ANC): λ_{fluor} : 510 nm. HRMS m/z (%): $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{O}_2\text{N}_2\text{B}$: Calc. 378.15, encontrado: 379.162601, (error: 3.603156 ppm).



CAPÍTULO

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) O'Brien, F. J. Biomaterials & Scaffolds for Tissue Engineering. *Mater. Today* **2011**, *14* (3), 88–95. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X).
- (2) Zhou, H.; Lawrence, J. G.; Bhaduri, S. B. Fabrication Aspects of PLA-CaP/PLGA-CaP Composites for Orthopedic Applications: A Review. *Acta Biomaterialia*. 2012, pp 1999–2016. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.01.031>.
- (3) Liu, H.; Slamovich, E. B.; Webster, T. J. Less Harmful Acidic Degradation of Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Bone Tissue Engineering Scaffolds through Titania Nanoparticle Addition. *Int. J. Nanomedicine* **2006**, *1* (4), 541–545. <https://doi.org/10.2147/nano.2006.1.4.541>.
- (4) Koh, L. D.; Cheng, Y.; Teng, C. P.; Khin, Y. W.; Loh, X. J.; Tee, S. Y.; Low, M.; Ye, E.; Yu, H. D.; Zhang, Y. W.; et al. Structures, Mechanical Properties and Applications of Silk Fibroin Materials. *Progress in Polymer Science*. 2015, pp 86–110. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.001>.
- (5) Etienne, O.; Schneider, A.; Kluge, J. A.; Bellemin-Laponnaz, C.; Polidori, C.; Leisk, G. G.; Kaplan, D. L.; Garlick, J. A.; Egles, C. Soft Tissue Augmentation Using Silk Gels: An In Vitro and In Vivo Study. *J. Periodontol.* **2009**, *80* (11), 1852–1858. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.090231>.
- (6) Kim, H. J.; Kim, U.-J.; Vunjak-Novakovic, G.; Min, B.-H.; Kaplan, D. L. Influence of Macroporous Protein Scaffolds on Bone Tissue Engineering from Bone Marrow Stem Cells. *Biomaterials* **2005**, *26* (21), 4442–4452. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.11.013>.
- (7) Kim, H. J.; Kim, U. J.; Kim, H. S.; Li, C.; Wada, M.; Leisk, G. G.; Kaplan, D. L. Bone Tissue Engineering with Premineralized Silk Scaffolds. *Bone* **2008**, *42* (6), 1226–1234. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.02.007>.
- (8) Kim, H. J.; Kim, U. J.; Leisk, G. G.; Bayan, C.; Georgakoudi, I.; Kaplan, D. L. Bone Regeneration on Macroporous Aqueous-Derived Silk 3-D Scaffolds. *Macromol. Biosci.* **2007**, *7* (5), 643–655. <https://doi.org/10.1002/mabi.200700030>.
- (9) Lovett, M.; Cannizzaro, C.; Daheron, L.; Messmer, B.; Vunjak-Novakovic, G.; Kaplan, D. L. Silk Fibroin Microtubes for Blood Vessel Engineering. *Biomaterials* **2007**, *28* (35), 5271–5279.

- <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.08.008>.
- (10) Wang, X.; Wenk, E.; Matsumoto, A.; Meinel, L.; Li, C.; Kaplan, D. L. Silk Microspheres for Encapsulation and Controlled Release. *COREL* **2007**, *117* (3), 360–370. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.11.021>.
- (11) Altman, G. H.; Horan, R. L.; Lu, H. H.; Moreau, J.; Martin, I.; Richmond, J. C.; Kaplan, D. L. Silk Matrix for Tissue Engineered Anterior Cruciate Ligaments. **2002**, *23*, 4131–4141.
- (12) Moreau, J. E.; Bramono, D. S.; Horan, R. L.; Kaplan, D. L.; Altman, G. H. Sequential Biochemical and Mechanical Stimulation in the Development of Tissue-Engineered Ligaments. *Tissue Eng. Part A* **2008**, *14* (7), 1161–1172. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0147>.
- (13) Lawrence, B. D.; Marchant, J. K.; Pindrus, M. A.; Omenetto, F. G.; Kaplan, D. L. Biomaterials Silk Film Biomaterials for Cornea Tissue Engineering. **2009**, *30*, 1299–1308. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.11.018>.
- (14) Gil, E. S.; Park, S. H.; Marchant, J.; Omenetto, F.; Kaplan, D. L. Response of Human Corneal Fibroblasts on Silk Film Surface Patterns. *Macromol. Biosci.* **2010**, *10*, 664–673. <https://doi.org/10.1002/mabi.200900452>.
- (15) Schneider, A.; Wang, X. Y.; Kaplan, D. L.; Garlick, J. A.; Egles, C. Biofunctionalized Electrospun Silk Mats as a Topical Bioactive Dressing for Accelerated Wound Healing. *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 2570–2578. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.12.013>.
- (16) Wharram, S. E.; Zhang, X.; Kaplan, D. L.; McCarthy, S. P. Electrospun Silk Material Systems for Wound Healing. *Macromol. Biosci.* **2010**, *10*, 246–257. <https://doi.org/10.1002/mabi.200900274>.
- (17) Hofmann, S.; Knecht, S.; Langer, R.; Kaplan, D. L.; Vunjak-Novakovic, G.; Merkle, H. P.; Meinel, L. Cartilage-like Tissue Engineering Using Silk Scaffolds and Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng.* **2006**, *12* (10), 2729–2738. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.2729>.
- (18) Meinel, L.; Betz, O.; Fajardo, R.; Hofmann, S.; Nazarian, A.; Cory, E.; Hilbe, M.; Mccool, J.; Langer, R.; Vunjak-novakovic, G.; et al. Silk Based Biomaterials to Heal Critical Sized Femur Defects. **2006**, *39*, 922–931.

- <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.04.019>.
- (19) Perrone, G. S.; Leisk, G. G.; Lo, T. J.; Moreau, J. E.; Haas, D. S.; Papenburg, B. J.; Golden, E. B.; Partlow, B. P.; Fox, S. E.; Ibrahim, A. M. S.; et al. The Use of Silk-Based Devices for Fracture Fixation. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms4385>.
- (20) Donald R. Askeland. *Ciencia e Ingenieria de Los Materiales*; 2005. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- (21) Ribeiro, M.; De Moraes, M. A.; Beppu, M. M.; Garcia, M. P.; Fernandes, M. H.; Monteiro, F. J.; Ferraz, M. P. Development of Silk Fibroin/Nanohydroxyapatite Composite Hydrogels for Bone Tissue Engineering. *Eur. Polym. J.* **2015**, *67*, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.03.056>.
- (22) Hollinger, J. O.; Leong, K. Poly(Alpha-Hydroxy Acids): Carriers for Bone Morphogenetic Proteins. *Biomaterials* **1996**, *17*, 189–194. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)85763-2](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)85763-2).
- (23) Sommerwerk, S.; Heller, L.; Kerzig, C.; Kramell, A. E.; Csuk, R. Rhodamine B Conjugates of Triterpenic Acids Are Cytotoxic Mitocans Even at Nanomolar Concentrations. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *127*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.12.040>.
- (24) Tidwell, T. T. Hugo (Ugo) Schiff, Schiff Bases, and a Century of β -Lactam Synthesis. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2008, pp 1016–1020. <https://doi.org/10.1002/anie.200702965>.
- (25) More, G.; Raut, D.; Aruna, K.; Bootwala, S. Synthesis, Spectroscopic Characterization and Antimicrobial Activity Evaluation of New Tridentate Schiff Bases and Their Co(II) Complexes. *J. Saudi Chem. Soc.* **2017**, *21* (8), 954–964. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2017.05.002>.
- (26) Chohan, Z. H.; Sumrra, S. H.; Youssoufi, M. H.; Hadda, T. B. Metal Based Biologically Active Compounds: Design, Synthesis, and Antibacterial/Antifungal/Cytotoxic Properties of Triazole-Derived Schiff Bases and Their Oxovanadium(IV) Complexes. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (7), 2739–2747. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.02.053>.
- (27) Ispir, E. The Synthesis, Characterization, Electrochemical Character, Catalytic

- and Antimicrobial Activity of Novel, Azo-Containing Schiff Bases and Their Metal Complexes. *Dye. Pigment.* **2009**, 82 (1), 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2008.09.019>.
- (28) Shi, L.; Ge, H. M.; Tan, S. H.; Li, H. Q.; Song, Y. C.; Zhu, H. L.; Tan, R. X. Synthesis and Antimicrobial Activities of Schiff Bases Derived from 5-Chloro-Salicylaldehyde. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, 42 (4), 558–564. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.11.010>.
- (29) Ceyhan, G.; Köse, M.; Tümer, M.; Demirtaş, I.; Şahin Yağlıoğlu, A.; McKee, V. Structural Characterization of Some Schiff Base Compounds: Investigation of Their Electrochemical, Photoluminescence, Thermal and Anticancer Activity Properties. *J. Lumin.* **2013**, 143, 623–634. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2013.06.002>.
- (30) Choi, Y. W.; Park, G. J.; Na, Y. J.; Jo, H. Y.; Lee, S. A.; You, G. R.; Kim, C. A Single Schiff Base Molecule for Recognizing Multiple Metal Ions: A Fluorescence Sensor for Zn(II) and Al(III) and Colorimetric Sensor for Fe(II) and Fe(III). *Sensors Actuators, B Chem.* **2014**, 194, 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.12.114>.
- (31) Saha, U. C.; Dhara, K.; Chattopadhyay, B.; Mandal, S. K.; Mondal, S.; Sen, S.; Mukherjee, M.; Van Smaalen, S.; Chattopadhyay, P. A New Half-Condensed Schiff Base Compound: Highly Selective and Sensitive PH-Responsive Fluorescent Sensor. *Org. Lett.* **2011**, 13 (17), 4510–4513. <https://doi.org/10.1021/ol201652r>.
- (32) Yang, Y.; Zhao, Q.; Feng, W.; Li, F. Luminescent Chemodosimeters for Bioimaging. *Chemical Reviews.* **2013**, pp 192–270. <https://doi.org/10.1021/cr2004103>.
- (33) Glotzbach, C.; Kauscher, U.; Voskuhl, J.; Kehr, N. S.; Stuart, M. C. A.; Fro, R.; Galla, H. J.; Ravoo, B. J.; Nagura, K.; Saito, S.; et al. Fluorescent Modular Boron Systems Based on NNN- and ONO- Tridentate Ligands: Self-Assembly and Cell Imaging. **2013**.
- (34) Adib, M.; Sheikhi, E.; Bijanzadeh, H. R.; Zhu, L. G. Microwave-Assisted Reaction between 2-Aminobenzoic Acids, 2-Hydroxybenzaldehydes, and

- Arylboronic Acids: A One-Pot Three-Component Synthesis of Bridgehead Bicyclo[4.4.0]Boron Heterocycles. *Tetrahedron* **2012**. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.02.030>.
- (35) Fairley, J. D.; Sackerer, D.; Zeilhofer, H. F.; Sturtz, G. Preliminary Experience With a Dynamic Resorbable Fixation Device for Craniosynostosis Surgery. *J. Craniofac. Surg.* **2012**, *23*, 98–100. <https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e3182418d39>.
- (36) Kundu, B.; Rajkhowa, R.; Kundu, S. C.; Wang, X. Silk Fibroin Biomaterials for Tissue Regenerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 457–470. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.043>.
- (37) Wang, L.; Li, C. Preparation and Physicochemical Properties of a Novel Hydroxyapatite/Chitosan-Silk Fibroin Composite. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *68*, 740–745. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.08.010>.
- (38) Cai, L.; Shao, H.; Hu, X.; Zhang, Y. Reinforced and Ultraviolet Resistant Silks from Silkworms Fed with Titanium Dioxide Nanoparticles. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2015**, *3*, 2551–2557. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00749>.
- (39) Teimouri, A.; Ebrahimi, R.; Chermahini, A. N.; Emadi, R. Fabrication and Characterization of Silk Fibroin/Chitosan/Nano γ -Alumina Composite Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *RSC Adv.* **2015**, *5* (35), 27558–27570. <https://doi.org/10.1039/C5RA01018G>.
- (40) Du, C.; Jin, J.; Li, Y.; Kong, X.; Wei, K.; Yao, J. Novel Silk Fibroin/Hydroxyapatite Composite Films: Structure and Properties. *Mater. Sci. Eng. C* **2009**, *29*, 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.05.010>.
- (41) Bhumiratana, S.; Grayson, W. L.; Castaneda, A.; Rockwood, D. N.; Gil, E. S.; Kaplan, D. L.; Vunjak-Novakovic, G. Nucleation and Growth of Mineralized Bone Matrix on Silk-Hydroxyapatite Composite Scaffolds. *Biomaterials* **2011**. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.12.058>.
- (42) Kim, H.; Che, L.; Ha, Y.; Ryu, W. Mechanically-Reinforced Electrospun Composite Silk Fibroin Nanofibers Containing Hydroxyapatite Nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *40*, 324–335. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.012>.

-
- (43) Yang, Y.; Yiu, H. H. P.; El Haj, A. J. On-Line Fluorescent Monitoring of the Degradation of Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering. *Analyst* **2005**, *130* (11), 1502–1506. <https://doi.org/10.1039/b506911d>.
- (44) Cunha-Reis, C.; El Haj, A. J.; Yang, X.; Yang, Y. Fluorescent Labeling of Chitosan for Use in Non-Invasive Monitoring of Degradation in Tissue Engineering. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2013**. <https://doi.org/10.1002/term.494>.
- (45) Bardsley, K.; Wimpenny, I.; Yang, Y.; El Haj, A. J. Fluorescent, Online Monitoring of PLGA Degradation for Regenerative Medicine Applications. *RSC Adv.* **2016**. <https://doi.org/10.1039/c6ra04690h>.
- (46) Liu, X.; Chen, B.; Li, X.; Zhang, L.; Xu, Y.; Liu, Z.; Cheng, Z.; Zhu, X. Self-Assembly of BODIPY Based PH-Sensitive near-Infrared Polymeric Micelles for Drug Controlled Delivery and Fluorescence Imaging Applications. *Nanoscale* **2015**, *7* (39), 16399–16416. <https://doi.org/10.1039/C5NR04655F>.
- (47) Yang, L.; Liu, Y.; Zhou, X.; Wu, Y.; Ma, C.; Liu, W.; Zhang, C. Asymmetric Anthracene-Fused BODIPY Dye with Large Stokes Shift: Synthesis, Photophysical Properties and Bioimaging. *Dye. Pigment.* **2016**. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2015.11.028>.
- (48) Chan-Navarro, R.; Jiménez-Pérez, V. M.; Muñoz-Flores, B. M.; Dias, H. V. R.; Moggio, I.; Arias, E.; Ramos-Ortíz, G.; Santillan, R.; García, C.; Ochoa, M. E.; et al. Luminescent Organoboron Compounds Derived from Salicylidenebenzohydrazide: Synthesis, Characterization, Structure, and Photophysical Properties. *Dye. Pigment.* **2013**, *99* (3), 1036–1043. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.07.039>.
- (49) Ibarra-Rodríguez, M.; Muñoz-Flores, B. M.; Dias, H. V. R.; Sánchez, M.; Gomez-Treviño, A.; Santillan, R.; Farfán, N.; Jiménez-Pérez, V. M. Fluorescent Molecular Rotors of Organoboron Compounds from Schiff Bases: Synthesis, Viscosity, Reversible Thermochromism, Cytotoxicity, and Bioimaging Cells. *J. Org. Chem.* **2017**, *82* (5), 2375–2385. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.6b02802>.
- (50) Williams, A. T. R.; Winfield, S. A.; Miller, J. N. Relative Fluorescence Quantum Yields Using a Computer-Controlled Luminescence Spectrometer*. *Analyst* **1983**, *108*, 1067–1071. <https://doi.org/10.1039/AN9830801067>.
-

-
- (51) Rockwood, D. N.; Preda, R. C.; Yücel, T.; Wang, X.; Lovett, M. L.; Kaplan, D. L. Materials Fabrication from Bombyx Mori Silk Fibroin. *Nat. Protoc.* **2011**, 6 (10), 1612–1631. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.379>.
- (52) Bagliotti Meneguín, A.; Stringhetti Ferreira Cury, B.; Evangelista, R. C. Films from Resistant Starch-Pectin Dispersions Intended for Colonic Drug Delivery. *Carbohydr. Polym.* **2014**, 99, 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.077>.
- (53) Sudeshna Saha, A. Harinath, Tarun K. Panda, H. P. N. Schiff-Base Supported Heterobicyclic Monomeric Boronates. *J. Organomet. Chem.* **2016**, 818, 37–41. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jorganchem.2016.05.016>.
- (54) Mitra, A.; DePue, L. J.; Struss, J. E.; Patel, B. P.; Parkin, S.; Atwood, D. A. Mononuclear Schiff Base Boron Halides: Synthesis, Characterization, and Dealkylation of Trimethyl Phosphate. *Inorg. Chem.* **2006**, 45, 9213–9224. <https://doi.org/10.1021/ic0607890>.
- (55) Graham, A. Organoboron Chemistry. In *Modern magnetic resonance*; Webb, G. A., Ed.; Springer International Publishing, 2008; pp 455–457.
- (56) Corona-López, M. M.; Jiménez Pérez, V. M.; Chan-Navarro, R.; Ibarra-Rodríguez, M.; Rasika Dias, H. V.; Chávez-Reyes, A.; Muñoz-Flores, B. M. Synthesis, Characterization, Photophysical Properties of New Fluorescent Boron Schiff Bases (BOSCHIBAs) and Their Application as Cytoplasm Staining Dyes in Vitro. *J. Organomet. Chem.* **2017**, 852, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2017.10.003>.
- (57) Santos, F. M. F.; Rosa, J. N.; Candeias, N. R.; Carvalho, C. P.; Matos, A. I.; Ventura, A. E.; Florindo, H. F.; Silva, L. C.; Pischel, U.; Gois, P. M. P. A Three-Component Assembly Promoted by Boronic Acids Delivers a Modular Fluorophore Platform (BASHY Dyes). *Chem. - A Eur. J.* **2016**. <https://doi.org/10.1002/chem.201503943>.
- (58) Kundu, B.; Rajkhowa, R.; Kundu, S. C.; Wang, X. Silk Fibroin Biomaterials for Tissue Regeneration ☆. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, 65 (4), 457–470. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.043>.
- (59) Wei, K.; Kim, B. S.; Kim, I. S. Fabrication and Biocompatibility of Electrospun
-

- Silk Biocomposites. *Membranes (Basel)*. **2011**, *1* (4), 275–298. <https://doi.org/10.3390/membranes1040275>.
- (60) Ming, J.; Jiang, Z.; Wang, P.; Bie, S.; Zuo, B. Silk Fibroin/Sodium Alginate Fibrous Hydrogels Regulated Hydroxyapatite Crystal Growth. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.014>.
- (61) H. G. Oliveira Barud, H. da S. Barud, M. Cavicchioli, T. S. do Amaral, O. B. de Oliveira Junior, D. M. Santos, A. L. de Oliveira Petersen, F. Celes, V. M. Borges, C. I. de Oliveira, P. F. de Oliveira, R. A. Furtado, S. C. Tavares, S. J. L. R. Preparation and Characterization of a Bacterial Cellulose/Silk Fibroin Sponge Scaffold for Tissue Regeneration. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *128*, 41–51. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.007>.
- (62) Lara-Cerón, J. A.; Jiménez-Pérez, V. M.; Molina-Paredes, A. A.; Rasika Dias, H. V.; Chávez-Reyes, A.; Ram Paudel, H.; Ochoa, M. E.; Muñoz-Flores, B. M. Luminescent Silk Fibroin with Organotin Compounds from Amino Acid Schiff Bases – Microwave-Assisted Synthesis, Chemo-Optical Characterization, Cytotoxicity, and Confocal Microscopy. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**. <https://doi.org/10.1002/ejic.201700187>.

CAPÍTULO

9. ANEXOS

9.1. ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (METODOLOGIA)

El análisis termogravimétrico (ATG) se llevó a cabo utilizando un TA SDT 2960 (TA Instruments, USA) a una velocidad de calentamiento de 10°C/min, de 20 a 600 °C, en una atmósfera de nitrógeno (velocidad de 50 mL/min), en porta muestra de alúmina abierto que contiene alrededor de 5 mg de muestra (Control=3.360mg, SF/B=4.251mg, SF/B/HA1%=4.511mg, SF/B/HA5%=3.316mg, SF/B/HA10%=4.236mg y SF/B/HA15%=9.218mg).

9.2. ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO (DISCUSIÓN)

La Figura 1 muestra las curvas TG de todos los biomateriales obtenidos (SF/B/HA1 al 15%). Es de suma importancia evaluar los materiales por diferentes técnicas, incluyendo determinación de sus propiedades termogravimétricas, para una caracterización más completa. Las principales pérdidas de peso se resumen en la tabla 1. Se pueden observar dos pérdidas de peso principales para todas las muestras. La primera se produce desde 90 °C (5-10%) aproximadamente, esto se debe a la evaporación del agua. La segunda pérdida de peso, alrededor de 280 a 600 °C es el segundo evento más significativo relacionado con la descomposición de la fibroína de seda. Sin embargo, los materiales con HA muestran una diferencia a comparación del control, en el caso del material SF/B/15% de HA, se observa que a 589 °C tiene una pérdida de 73% en peso, mientras que el control un 93%, demostrando así que la HA ayuda a tener una mayor estabilidad térmica dentro de los biomateriales.

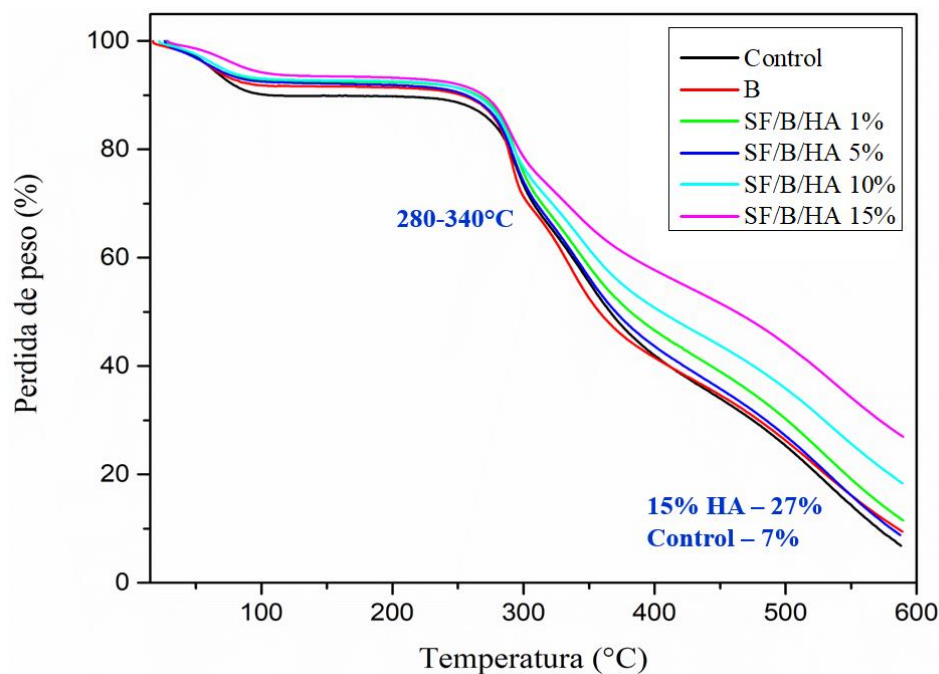


Figura 37. Curvas de TGA de los biomateriales.

Tabla 1. Principales pérdidas de peso de los compósitos.

| Compósito | 100 °C | 280 °C | 340 °C | 600 °C |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|
| Control | 90.1% | 83.9% | 59.1% | 6.8% |
| B | 91.8% | 84.9% | 56.4% | 9.4% |
| SF/B/HA 1% | 92.8% | 86.8% | 61.7% | 11.4% |
| SF/B/HA 5% | 92.5% | 85.2% | 59.8% | 8.8% |
| SF/B/HA 10% | 93.1% | 86.2% | 64.6% | 18.3% |
| SF/B/HA 15% | 94.2% | 87.4% | 68.1% | 26.9% |

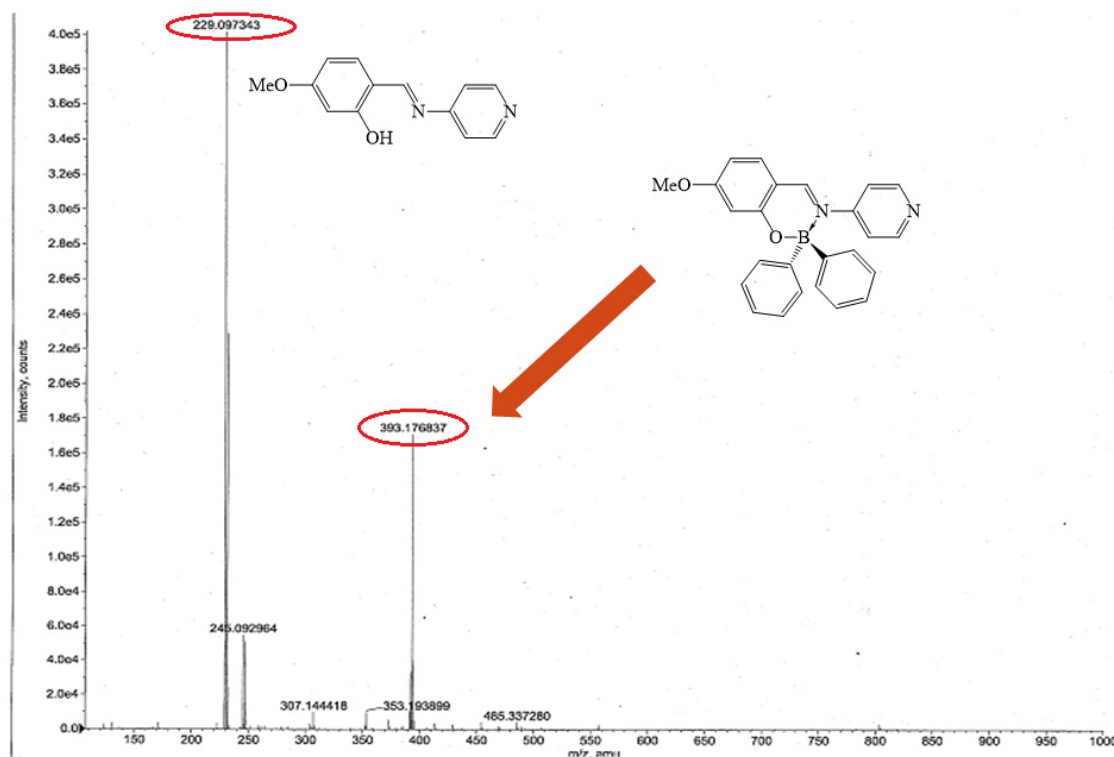


Figura 2. Espectro de masas de alta resolución para el compuesto **2**.

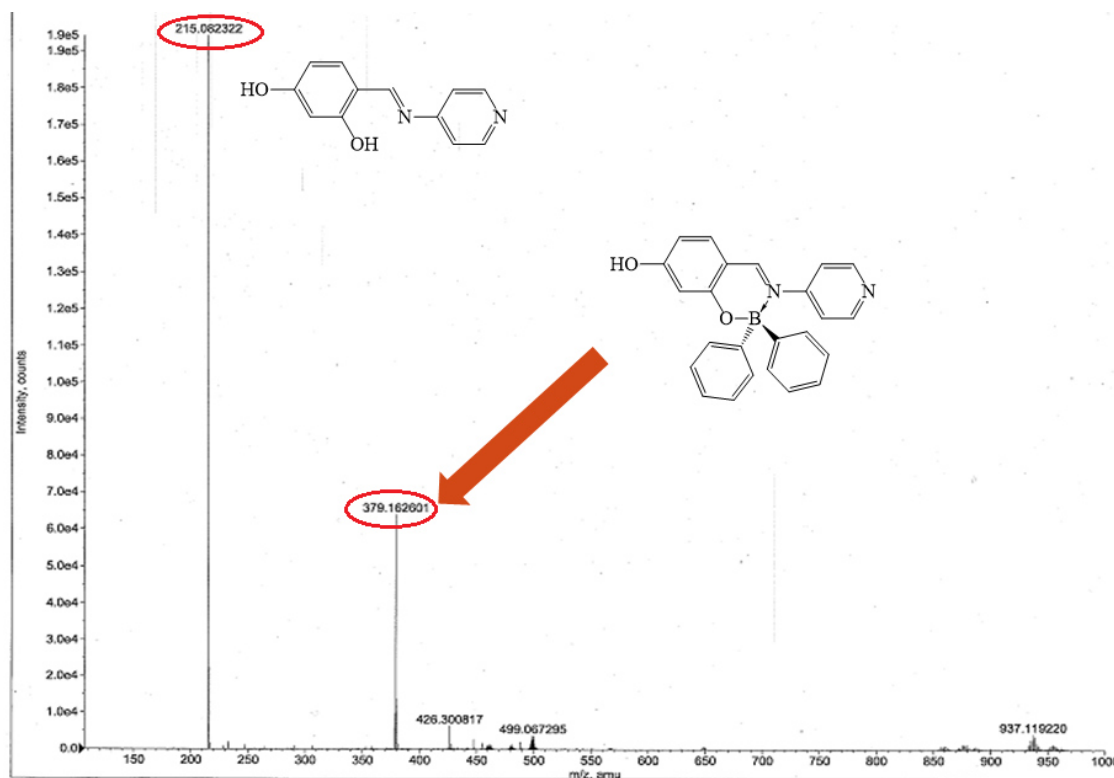


Figura 3. Espectro de masas de alta resolución para el compuesto **3**.

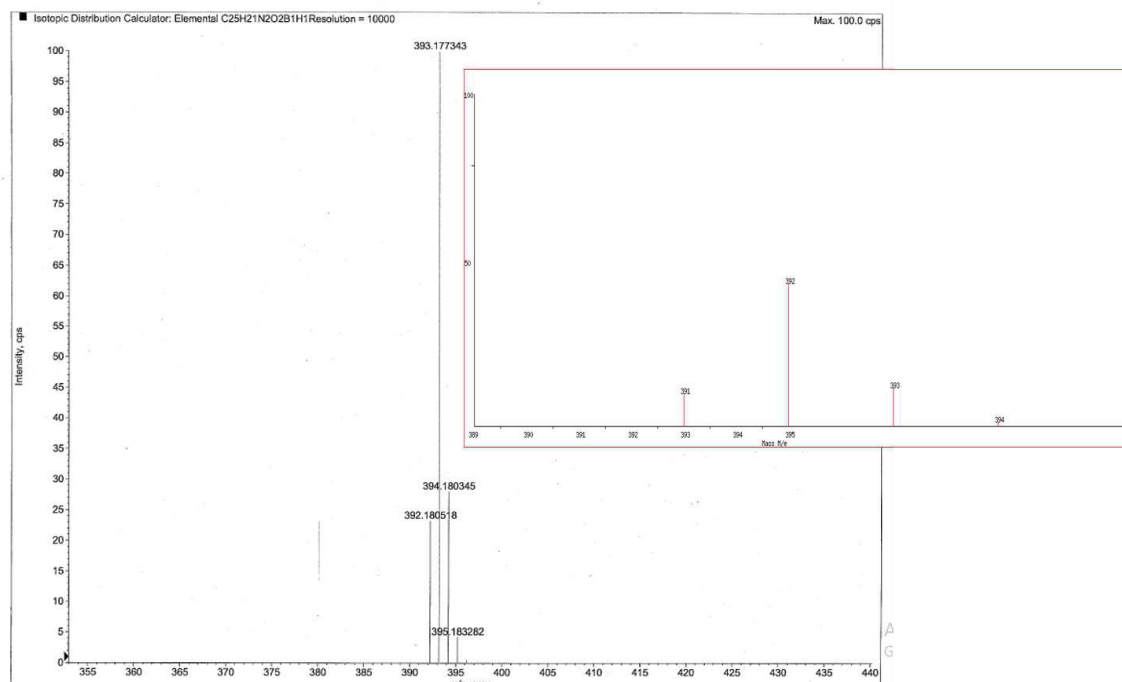


Figura 4. Comparación de distribuciones isotópicas teóricas y experimentales del compuesto **2**.

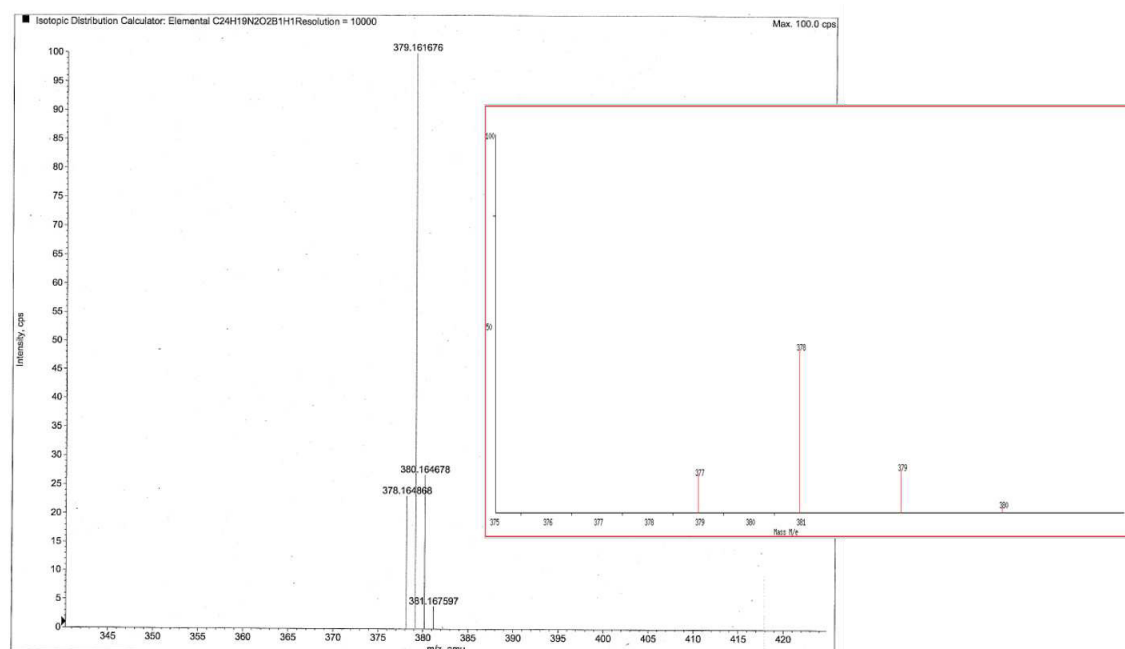


Figura 5. Comparación de distribuciones isotópicas teóricas y experimentales del compuesto **3**.

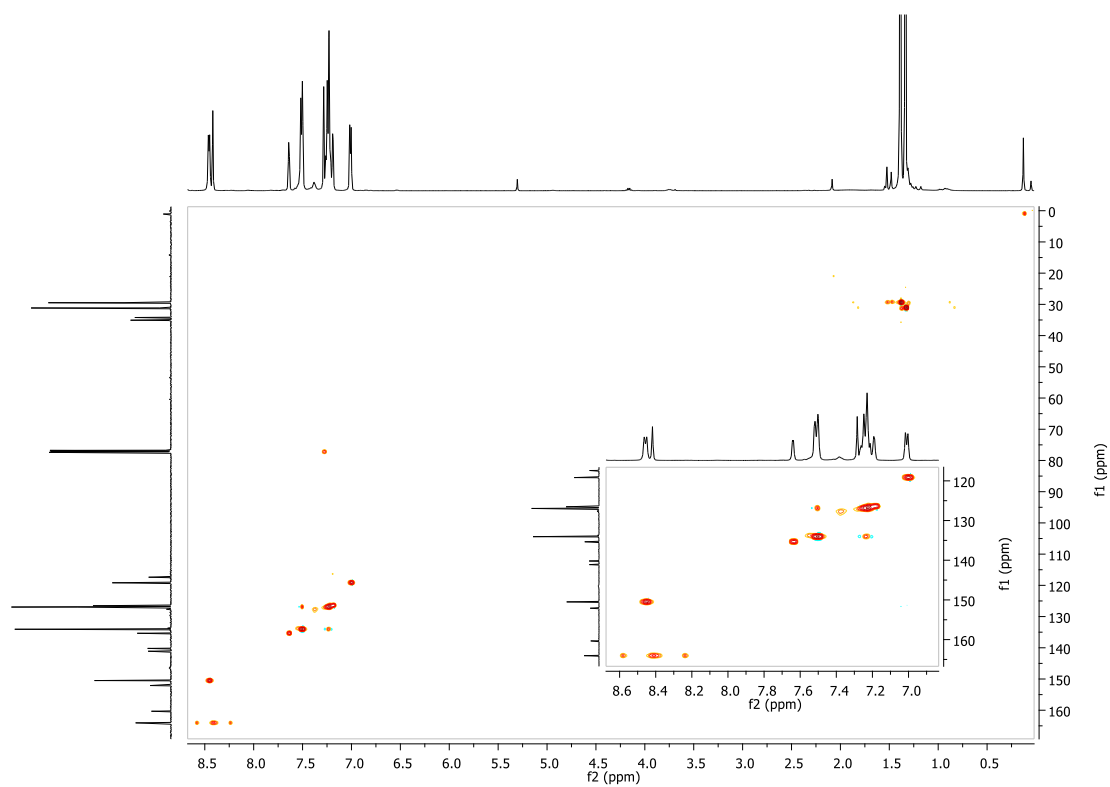


Figura 6. Espectro HSQC (CDCl_3) del compuesto **1**.

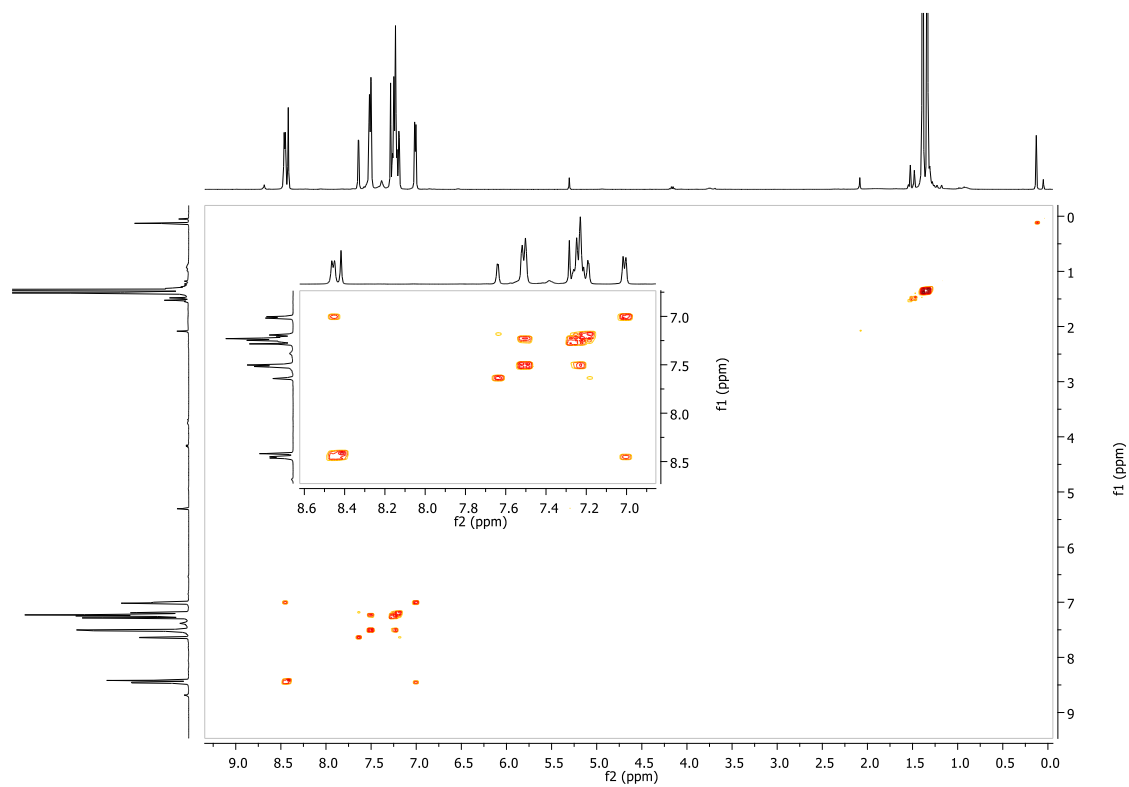


Figura 7. Espectro COSY (CDCl₃) del compuesto **1**.

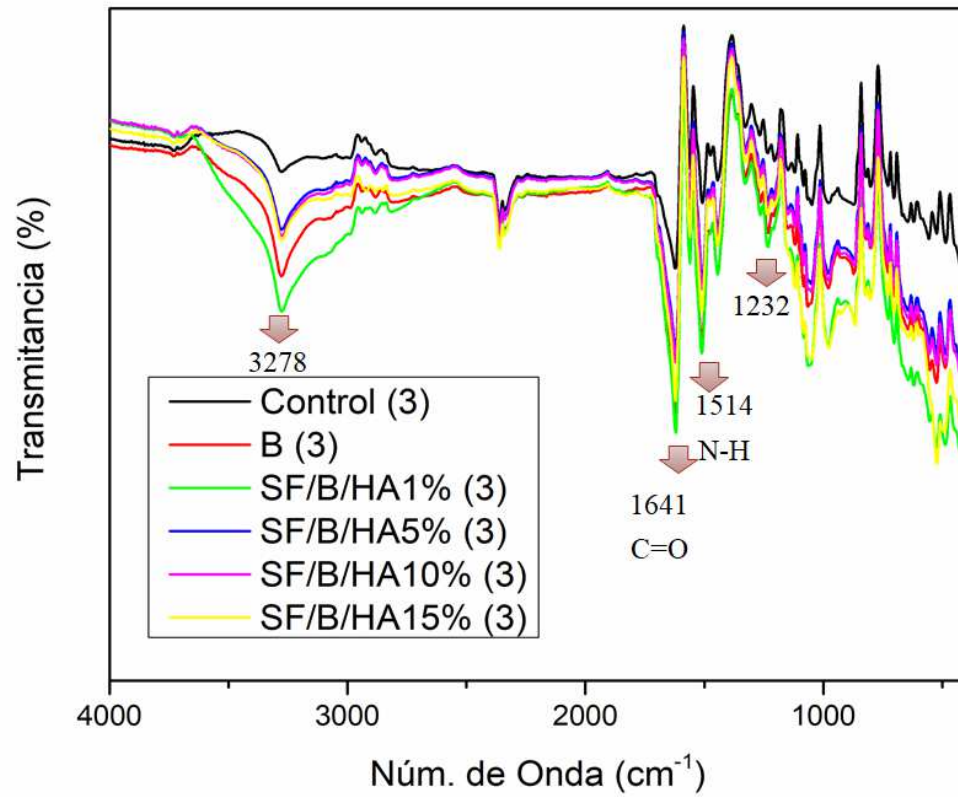


Figura 8. Infrarrojo de los biomateriales después de 3 semanas de degradación.

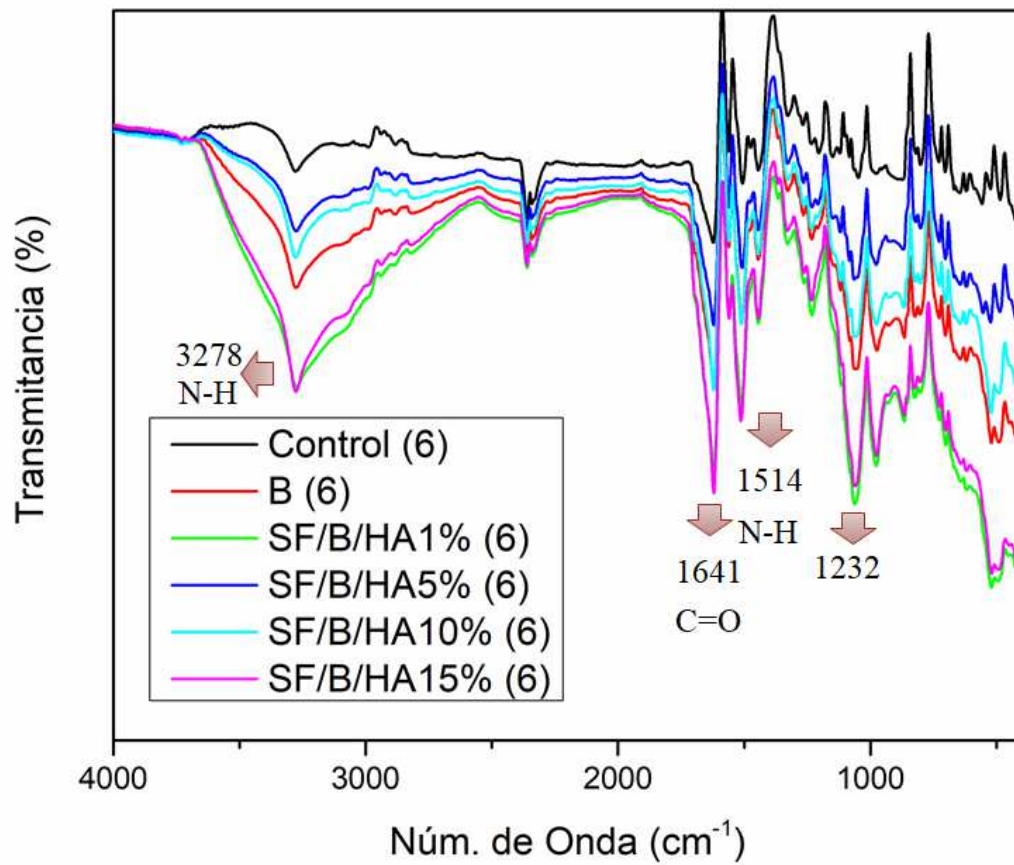


Figura 9. Infrarrojo de los biomateriales después de 6 semanas de degradación.