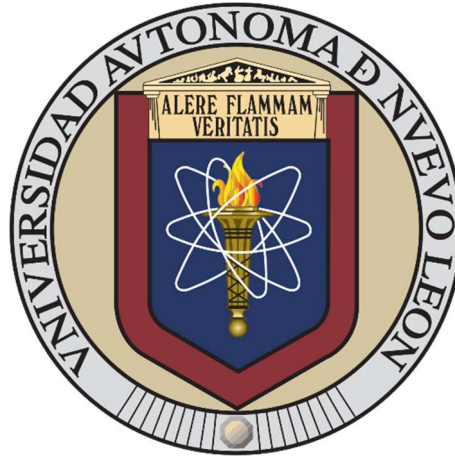


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**DESARROLLO DE MEMBRANAS PARA INGENIERÍA DE
TEJIDOS BASADAS EN NANOFIBRAS DE CMC-AgNPs/PVA**

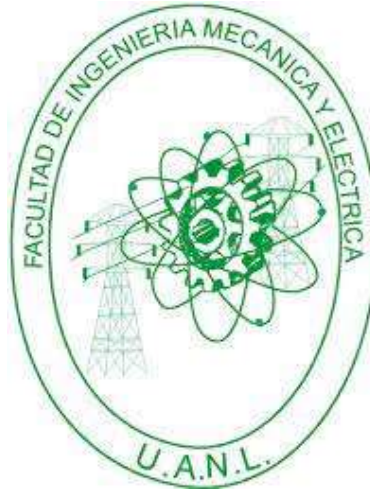
Por

ARTURO ABRAHAM CIENFUEGOS SARMIENTO

Como requisito parcial para obtener el Grado de Maestría en
Ciencias de la Ingeniería con Orientación en Materiales

Enero 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**DESARROLLO DE MEMBRANAS PARA INGENIERÍA DE
TEJIDOS BASADAS EN NANOFIBRAS DE CMC-AgNPs/PVA**

Por

ARTURO ABRAHAM CIENFUEGOS SARMIENTO

Como requisito parcial para obtener el Grado de Maestría en
Ciencias de la Ingeniería con Orientación en Materiales

Enero 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica
Posgrado

Los miembros del Comité de Evaluación de Tesis recomendamos que la Tesis "Desarrollo de membranas para ingeniería de tejidos basadas en nanofibras de CMC-AgNPs/PVA", realizada por el estudiante Arturo Abraham Cienfuegos Sarmiento, con número de matrícula 1511386, sea aceptada para su defensa como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Ingeniería con orientación en Materiales.

El Comité de Evaluación de Tesis

Dr. Marco Antonio Garza Navarro
Director

Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos
Co-director

Dr. Virgilio Ángel González González
Revisor

Dr. Enrique Manuel López Cuéllar
Revisor

Dra. Elizabeth Madla Cruz
Revisor

Vo.Bo.


Dr. Simón Martínez Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

Institución 190001

Programa 514544

Acta Núm. 4129

Ciudad Universitaria, a 3 de marzo de 2023

Índice

RESUMEN.....	1
CAPÍTULO 1.	4
ANTECEDENTES	4
1.1. Introducción	4
1.2. La ingeniería de tejidos.....	4
1.3. Preparación de membranas basadas en nanofibras	6
1.4. Electrohilado de nanofibras.....	8
1.5. La carboximetil-celulosa	12
1.6. Las nanopartículas de plata	14
1.7. Hipótesis y objetivo general	15
1.7.1. Hipótesis	15
1.7.2. Objetivo General	16
CAPÍTULO 2.....	17
EXPERIMENTACIÓN	17
2.1. Introducción	17
2.2. Síntesis de compósitos CMC-AgNPs.....	18
2.2.1. Materiales.....	18
2.2.2. Metodología de síntesis.....	18
2.3. Preparación de membranas nanofibrosas.....	19
2.3.1. Materiales.....	19
2.3.2. Metodología de preparación	19
2.4. Caracterización de las muestras sintetizadas	21
2.4.1. Caracterización del compósito CMC-AgNPs	21
2.4.2. Caracterización de las membranas nanofibrosas	22
2.4.3. Ensayos bactericidas	23
2.4.4. Ensayo de viabilidad celular	24
CAPÍTULO 3.	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
3.1. Introducción	26
3.2. Caracterización morfológica y cristalina del compósito CMC-AgNPs	26
3.3. Caracterización estructural y química del compósito CMC-AgNPs	27
3.4. Caracterización morfológica de las membranas nanofibrosas	30
3.5. Caracterización espectroscópica de las membranas nanofibrosas	31
3.6. Caracterización mecánica de las membranas nanofibrosas.....	34

3.7. Actividad bactericida de las membranas nanofibrosas.....	36
3.8. Viabilidad celular en las membranas nanofibrosas	39
CAPÍTULO 4.	42
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	42
4.1. Conclusiones	42
4.2. Recomendaciones	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

Indice de Figuras

Figura 1. Esquema de un sistema para el electrohilado de soluciones y mezclas poliméricas [26].	9
Figura 2. Estructura molecular de: (a) celulosa; (b) carboximetil-celulosa. ...	12
Figura 3. Diagrama en bloque de la metodología experimental.	17
Figura 4. Fotografía de las mezclas poliméricas preparadas a las relaciones en volumen PVA:CMC-AgNPs indicadas en cada vial.	21
Figura 5. Fotografía en la que se ilustra a manera de ejemplo las membranas obtenidas mediante el proceso de electrohilado: (a) M91; (b) M55.	21
Figura 6. Muestra en forma de hueso. a) Plano 2D con medidas; b) Ejemplo de la muestra a probar.	23
Figura 7. Caracterización morfológica y cristalina del compuesto CMC-AgNPs, en donde se muestra: (a) imagen de HAADF-STEM; (b) distribución de tamaño de partícula; (c) imagen BF obtenida en alta magnificación para una nanopartícula; y (d) patrón SAED indexado.	27
Figura 8. Espectros ATR-FTIR obtenidos para: (a) reactivo CMC; y (b) compuesto CMC-AgNPs.	28
Figura 9. Imagen en donde se ilustran: (a) espectros C1s y O1s obtenidos para el reactivo CMC; (b) estructura molecular del reactivo CMC; y (c) espectros C1s, O1s y Ag3d medidos para el compuesto CMC-AgNPs.	29
Figura 10. Caracterización morfológica de las membranas nanofibrosas, en donde se muestran imágenes de SEM por la técnica de SE y distribución de diámetro de fibra obtenidas, respectivamente, para: (a) y (b) MPVA; (c) y (d) M91; (e) y (f) M82; (g) y (h) M73; (i) y (j) M64; (k) y (l) M55.	30
Figura 11. Espectros ATR-FTIR obtenidos para: (a) reactivo LMP; (b) HLP; y (c) MPVA.	31
Figura 12. Espectros ATR-FTIR obtenidos para: (a) M91; (b) M82; (c) M73; (d) M64; y (e) M55.	33
Figura 13. Espectros C1s y O1s obtenidos por XPS para las membranas nanofibrosas: (a) MPVA; y (b) M64.	34
Figura 14. Curvas esfuerzo-deformación obtenidas para las membranas nanofibrosas indicadas.	35
Figura 15. Actividad bactericida obtenida para los especímenes indicados contra las bacterias E. coli y S. aureus. Los datos se representan como la media $\pm$ desviación estándar para cada conjunto experimental.	37

Figura 16. Viabilidad celular obtenida para los especímenes indicados luego de 1 y 5 días de incubación. Los datos se representan como la media $\pm$ desviación estándar para cada conjunto experimental.39

Indice de Tablas

Tabla I. Muestras de membranas nanofibrosas preparadas.20

Tabla II. Diámetro de nanofibras y propiedades mecánicas obtenidos de las membranas nanofibrosas. Los datos se expresan en media $\pm$ desviación estándar.36

RESUMEN

La ingeniería de tejidos es una metodología que se sigue para combatir lesiones tisulares a partir de la imitación del microambiente fisiológico. En este sentido, en la literatura científica se han sugerido diversas aproximaciones para la fabricación de plataformas que imitan características estructurales y fisicoquímicas de tejidos naturales, a partir del uso de biomateriales. El desarrollo de estas plataformas se ha enfocado actualmente a la regeneración de tejidos del sistema cardiovascular, piel, musculoesquelético y neuronal. De entre estas plataformas, las membranas nanofibrosas han surgido como una alternativa viable para el desarrollo de andamios útiles en la ingeniería de tejidos. Así, en este trabajo de investigación se reporta el desarrollo de membranas nanofibrosas con potenciales aplicaciones en la ingeniería de tejidos, a partir del electrohilado de mezclas poliméricas acuosas de alcohol polivinílico y compósitos basados en nanopartículas de plata inmovilizadas en carboximetil-celulosa.

La preparación de estas membranas se realizó a través de una metodología de tres pasos, caracterizada por: 1) la síntesis verde del compósito CMC-AgNPs, utilizando la CMC como agente reductor y estabilizante; (2) la preparación de mezclas poliméricas acuosas basadas en PVA y el compósito CMC-AgNPs; y (3) preparación de membranas nanofibrosas a partir del electrohilado de mezclas poliméricas acuosas CMC-AgNPs/PVA. Las muestras obtenidas a partir de esta metodología fueron caracterizadas por las técnicas de microscopia electrónica de transmisión (TEM), microscopia electrónica de barrido (SEM), espectroscopia de infrarrojo (ATR-FTIR), espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS), ensayos mecánicos de tensión, ensayos bactericidas y ensayos de viabilidad celular.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la caracterización del compósito CMC-AgNPs por microscopia electrónica de transmisión, la estructura

cristalina de las nanopartículas sintetizadas es congruente con la esperada para la plata. El centro de su distribución de tamaño de partícula se encuentra en 10.4 nm, con una desviación estándar de ± 2.2 nm. Además, los espectros de infrarrojo medidos para este compósito muestran que la estructura molecular de la CMC no cambia de manera visible luego de la síntesis de las AgNPs. No obstante, es posible identificar cambios en la posición de las bandas relacionadas con la vibración de enlaces en los grupos carboximetilo del polímero. Esto sugiere que existe una interacción al menos física entre sus moléculas y la superficie de AgNPs. La evidencia experimental recabada por espectroscopia foto-electrónica de rayos X indica que las AgNPs sintetizadas están inmovilizadas en la CMC a través de enlaces de coordinación con sus grupos carboximetilo.

Como lo ilustran las imágenes obtenidas mediante microscopia electrónica de barrido para las membranas nanofibrosas preparadas, las nanofibras electrohiladas se encuentran libres de defectos. Además, se observó que el centro de la distribución de diámetro de fibra se mueve hacia valores menores a medida que aumenta el contenido en peso del compósito CMC-AgNPs en la mezcla electrohilada. De acuerdo con la caracterización espectroscópica de estas membranas, este fenómeno se debe a las interacciones tipo puente acetal y/o hidrógeno entre los grupos carboximetilo, acetilo e hidroxilo en la CMC y PVA. Los resultados obtenidos de los ensayos mecánicos de tensión muestran que tanto la disminución en el diámetro de fibra, como las interacciones entre las moléculas de ambos polímeros provocan un incremento en la rigidez de las membranas nanofibrosas. Este incremento en la rigidez está relacionado con el aumento del contenido en peso de CMC-AgNPs en las membranas nanofibrosas. Las propiedades mecánicas de estas membranas son comparables con las deseadas para andamios útiles en ingeniería de tejidos.

Los ensayos bactericidas realizados contra *E. coli* y *S. aureus* indicaron que existen una disminución en la cantidad de bacterias viables en los cultivos que estuvieron en contacto con las membranas nanofibrosas preparadas. Esta disminución está relacionada con el incremento del contenido en peso de AgNPs en dichas membranas. No obstante, la evidencia experimental obtenida de estos ensayos indicó que las membranas nanofibrosas no se comportan como un agente bactericida tradicional. Más bien, evitan la proliferación de especies Grampositiva y Gramnegativa en su superficie. Esto puede ser una ventaja terapéutica para el tratamiento de lesiones tisulares, ya que podría reducir el uso de antibióticos durante el proceso de regeneración de tejido.

Finalmente, los ensayos de viabilidad celular mostraron que luego de 1 día de incubación, el promedio de células de Schwann viables en los cultivos que estuvieron en contacto con membranas nanofibrosas es semejante al obtenido para cultivos incubados sin membranas. Luego de 5 días de incubación, estos cultivos mostraron un incremento en el promedio de células viables, respecto al obtenido luego de 1 día. Este incremento fue comparable con el medido para cultivos incubados en ausencia de membranas. Esto indica que las membranas nanofibrosas no inducen una toxicidad significativa en el medio biológico y que proveen un ambiente adecuado para la proliferación celular. Este comportamiento es congruente con lo esperado para nanomateriales útiles como andamios para ingeniería de tejidos.

CAPÍTULO 1.

ANTECEDENTES

1.1. Introducción

En este capítulo se expondrán a detalle los antecedentes científicos que motivaron este trabajo de tesis. En primer lugar, se discutirán los aspectos relevantes de la ingeniería de tejidos, haciendo énfasis en las características que deben de presentar materiales y estructuras útiles para dicha aplicación. Posteriormente se describirán las rutas de preparación que son comúnmente seguidas para la obtención de materiales enfocados a ingeniería de tejidos. Luego, se explicará detalladamente la técnica de electrohilado, así como algunas de las aproximaciones reportadas para la preparación de membranas basadas en nanofibras a través de dicha técnica. Además, abordaran las propiedades que posicionan a estas membranas como candidatos para su uso en ingeniería de tejidos. Asimismo, se describirán las características estructurales de la carboximetil-celulosa y las aproximaciones experimentales reportadas en literatura para la obtención de nanofibras de este polisacárido. Posteriormente, se discutirán las características cristalinas de la plata, sus propiedades bactericidas, así como las rutas seguidas para la síntesis verde de nanopartículas de este metal seminoble. Finalmente, se establecerá la hipótesis y el objetivo que sustentan este trabajo de tesis.

1.2. La ingeniería de tejidos

En términos generales, la ingeniería de tejidos es una metodología seguida para combatir lesiones tisulares a partir de la imitación del microambiente fisiológico [1]. Esta metodología es también conocida por algunos autores como “medicina regenerativa” y tiene como objetivo la regeneración y/o reemplazo de tejidos u órganos dañados [2, 3]. Diversos grupos de investigación alrededor del mundo se han enfocado en la fabricación de distintas plataformas que pretenden imitar las características estructurales y

fisicoquímicas de tejidos naturales [3, 4]. Estas plataformas son diseñadas para ofrecer un microambiente que facilite el anclaje de células mediante el uso de biomateriales [3-5], y se clasifican comúnmente en dos grandes familias: (a) andamios basados en polímeros naturales; (b) implantes sintéticos basados en polímeros, cerámicos o compósitos. En la actualidad, el desarrollo de este tipo de plataformas se ha encaminado a la regeneración de tejidos del sistema cardiovascular, piel, musculoesquelético y neuronal [6-9].

La regeneración de hueso es un ejemplo de estas plataformas ya que es un proceso natural capaz de cubrir espacios pequeños como fracturas o defectos óseos [10]. El hueso es considerado un compósito natural basado en células embebidas en una matriz extracelular (MEC). La MEC está compuesta principalmente de dos fases [11]: (1) nanofibras entrecruzadas, que se autoensamblan a partir de moléculas de colágeno tipo I; y (2) nanocristales tipo plato de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ depositados a lo largo de las nanofibras de colágeno. Estos componentes dirigen el proceso de biomineralización de hueso, mismo que ocurre sobre la MEC. En virtud de ello, la ingeniería de tejidos para regeneración ósea tiene por objetivo replicar las funciones de los componentes antes mencionados, a fin de brindar soporte para las células encargadas de la biomineralización. Estos soportes son conocidos como andamios y su función es cumplir el papel de la MEC, razón por la que deben presentar una morfología fibrosa [10].

Por otro lado, las heridas del tejido nervioso afectan a millones de personas en el mundo, dejando secuelas cognitivas, motoras y sensoriales a diversos grupos etarios. El sistema nervioso central está conformado por el encéfalo y la medula espinal, los cuales tienen una limitada capacidad regenerativa [11]. Las lesiones del sistema nervioso central incluyen necrosis neuronal, desmielinización, daños oxidativos, inflamaciones y lesiones axonales [12]. A fin de tratar este tipo de patologías, se ha propuesto el uso de plataformas implantables que faciliten la regeneración de tejido nervioso, emulando la MEC

[11]. En este sentido, las propiedades deseables para estas plataformas son: (a) biocompatibilidad, para facilitar la adhesión, funcionalidad y proliferación celular; (b) baja toxicidad, a fin de evitar efectos adversos que puedan dar paso a la formación de un neuroma; (c) biodegradabilidad, para evitar inflamación crónica en el sitio del implante; y (d) módulo de Young, resistencia a la tensión y al corte adecuados para su manipulación.

En consideración de lo anterior, las membranas basadas en nanofibras de polímeros naturales o sintéticos emergen como una alternativa viable para el desarrollo de andamios útiles en la ingeniería de tejidos [1]. Este tipo de membranas pueden exhibir las características químicas y mecánicas antes citadas, así como también una porosidad comparable con la observada en la MEC.

1.3. Preparación de membranas basadas en nanofibras

En la literatura especializada se pueden consultar diversos reportes relacionados con la preparación de membranas basadas en nanofibras de polímeros naturales y sintéticos a partir de técnicas como el autoensamblaje, impresión 3D y electrohilado [1]. Por ejemplo, la técnica de autoensamblaje se basa en un proceso en el que pequeños bloques de moléculas de polímeros, surfactantes y péptidos, entre otros, son ensamblados a través de interacciones de atracción o repulsión entre ellos. El proceso de autoensamblaje consta de diversos pasos, dependiendo del tipo de bloques usados, y puede lograrse sobre una plantilla o en una solución [13]. Así, la estructura molecular juega un papel fundamental, ya que interacciones de tipo puente de hidrógeno, Van der Waals, electrostáticas, entre otras, son las que dan las propiedades que conducen a la formación de estructuras como las nanofibras [14]. Como se ha indicado en la literatura especializada, las nanofibras pueden ser tan delgadas como 10 nm, además de ser provistas de características biocompatibles a fin de proveer la estructura necesaria para

que las células puedan promover la formación de tejido de distintos tipos [13]. La mayoría de los reportes se enfocan en la obtención de hidrogeles basados en nanofibras de péptidos y de proteínas [13-16]. Asimismo, se ha indicado que esta ruta es muy sensible a cambios en el pH y concentración de reactivos, además de que es difícilmente escalable para la producción de andamios basados en nanofibras [1].

Por su parte, la impresión en 3D es una técnica basada en la deposición de material fundido o en forma de solución líquida sobre un sustrato, siguiendo un patrón de deposición pre-definido por diseño asistido por computadora (CAD). En esta ruta, el material es extruido capa por capa a través de una boquilla con tamaño ajustable a una rapidez definida, a fin de apilar fibras y producir andamios con una geometría y porosidad deseadas [17]. Recientemente se ha reportado la obtención de compósitos basados en ácido poliláctico (PLA) y nanofibras de ZnO. Este compósito se sintetiza mediante la impresión de una solución de PLA y nanofibras de ZnO en cloroformo, a manera de una placa de 60 x 60 mm, cuyo diseño fue hecho por CAD [18]. Además, se ha propuesto la impresión 3D de compósitos basados en PLA reforzado con nanofibras de celulosa (CNF) injertadas en PLA (PLA-g-CNF) [19]. Esta impresión se logró a partir del uso de soluciones de PLA y PLA-g-CNF en cloroformo para obtener un monolito con dimensiones de 60 x 12.8 x 3.2 mm, que fue diseñado en el software Autodesk Fusion 360 [19, 20]. No obstante, la impresión en 3D da como resultado fibras con un diámetro de varios cientos de micrómetros, así como un amplio tamaño de poros, lo que dificulta la adhesión de células al andamio [17].

Se ha documentado la combinación de técnicas como el electrohilado y la impresión 3D para la fabricación de andamios basados en policaprolactona (PCL) y gelatina de piel porcina [17]. Para ello se siguió una metodología de 5 pasos que consistió en: (1) preparación de las soluciones de PCL y gelatina en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP) al 12 %p/v; (2) electrohilado de la

solución a 15 kV, flujo de 1 mL/h y separación entre aguja y colector de 12 cm; (3) dispersión de la membrana obtenida por electrohilado en una solución de terbutanol, mediante el uso de un homogenizador mecánico (15,000 RPM); (4) impresión de un monolito de PCL a partir de PCL reblandecido, siguiendo un patrón de rejillas apiladas; y (5) rellenado de las rejillas del monolito con la dispersión de nanofibras PCL/gelatina.

Finalmente, la técnica de electrohilado se basa en uso de una diferencia de potencial entre dos electrodos para producir nanofibras desde polímeros o mezclas poliméricas en solución. Esta técnica se ha usado exitosamente para la obtención de andamios basados en nanofibras de polímeros sintéticos como la PCL [21-23], así como de mezclas de polímeros semi-sintéticos, como la carboximetil-celulosa (CMC) y el quitosán (QTO), con sintéticos como el alcohol polivinílico (PVA) y óxido de polietileno (PEO) [23-25]. Los andamios obtenidos mediante esta técnica denotan una área superficial y distribución de poros similares a los de la MEC, favoreciendo la adhesión y proliferación de células de distintos tipos [23]. Así, la técnica de electrohilado por sí misma surge como una ruta idónea para la obtención de andamios útiles para ingeniería de tejidos. Dado el interés de este trabajo de investigación, a continuación, se detallará en que consiste la técnica del electrohilado.

1.4. Electrohilado de nanofibras

El proceso de electrohilado puede ser descrito de la siguiente manera [26]. Este proceso da inicio una vez que una solución polimérica es polarizada por una fuente de alto voltaje, lo que provoca interacciones repulsivas entre las cargas dentro de la solución y atractivas para con el colector conectado a tierra. Esto genera una fuerza de tensión que actúa sobre la solución, la cual se elonga desde una gota de solución hasta formar una fibra. Lo anterior ocurre una vez que la intensidad del campo eléctrico generado por la fuente en la solución supera su tensión superficial, facilitando la formación de un cono en

la punta del capilar llamado “cono de Taylor”. Posteriormente, este cono se elonga y da lugar al denominado “chorro polimérico” que viaja hacia el colector. Mientras el chorro polimérico viaja por la atmósfera del experimento hacia el colector, éste experimenta un movimiento caótico que incrementa la distancia recorrida y el tiempo que tarda en llegar al colector. Esto contribuye a la evaporación del solvente y a la subsecuente depositación de las nanofibras sobre el colector (véase Figura 1).

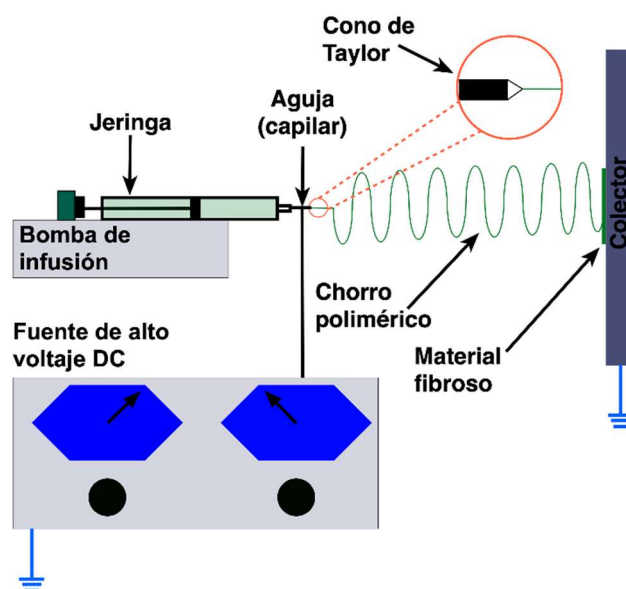


Figura 1. Esquema de un sistema para el electrohilado de soluciones y mezclas poliméricas [26].

Como se mencionó en el apartado anterior, la técnica de electrohilado se ha usado para la obtención de membranas nanofibrosas útiles como andamios para ingeniería de tejidos. Por ejemplo, se ha reportado la obtención de membranas de PCL, a partir del electrohilado de soluciones ácidas al 12 y 15 %p/v [27]. Estas soluciones se prepararon usando como solvente una mezcla de ácido acético (AA) y ácido fórmico (AF) a una relación AA:AF de 3:7 en volumen y 0.7 g de ácido cítrico. El electrohilado de las soluciones se logró usando una jeringa de teflón de 6 mL, aguja de calibre 22, un flujo de 1.5 mL/h, separación entre aguja y colector (hoja de aluminio) de 15 cm, un voltaje de 20 kV y humedad relativa de entre 35 y 50 %.

Las membranas fueron posteriormente esterilizadas con luz ultravioleta (UV) durante 2 h por cada lado, para finalmente tratarlas químicamente (conjugación) con glicoproteínas tales como fibronectina (FBN), laminina (LAM) o el péptido ácido arginil-glicil-aspártico (RBD) [27]. La conjugación de las membranas con proteínas o péptido se llevó a cabo a fin de mejorar la adhesión *in vitro* de la línea celular de neuroblastoma, SH-SY5Y. Mediante esta metodología fue posible la obtención de membranas con un diámetro de fibra de entre 200 y 600 nm para la solución de PCL al 12 %p/v; y de entre 600 y 1100 nm para la solución al 15 %p/v. Más aún, se determinó que su grado de hinchabilidad varía entre 12.4 y 52.3 %, dependiendo de la proteína y/o péptido conjugado en la membrana. Asimismo, su degradación alcanzó una pérdida en peso del 20 % luego de tres meses en cultivo de fluido cerebroespinal artificial. Finalmente, se observó que las membranas no inducen toxicidad en el medio de cultivo de la línea celular SH-SY5Y; y se demostró que la proliferación de estas células se incrementa significativamente en membranas conjugadas con LAM y FBN luego de 2 días de incubación, dada la afinidad de las células para con estas glicoproteínas.

Además, se ha reportado la preparación de membranas basadas en nanofibras del copolímero PCL-lignina, a partir del electrohilado de mezclas poliméricas PCL:PCL-lignina, usando al HFP como solvente [8]. Estas soluciones se prepararon a relaciones en peso PCL:PCL-lignina de 95:5, 90:10 y 85:15; y se electrohicilaron usando una jeringa de 5 mL, aguja calibre 22, un flujo de 1 mL/hr, una separación entre aguja y colector (hoja de aluminio) de 10 cm y un voltaje de 15 kV. Así, se obtuvieron membranas nanofibrosas con un diámetro de fibra de entre 338 y 330 nm, cuyas propiedades mecánicas, tales como módulo de Young, resistencia a la tensión y elongación a la ruptura se encuentran en intervalos de 16.1 a 24 MPa, 6.3 a 13.3 MPa y de 86 a 137 %, respectivamente. Más aún, se observó que células como las Schwann proliferan de manera adecuada sobre las membranas luego de 3 días de

incubación *in vitro*. Esta proliferación es más evidente en las membranas con alto contenido de lignina.

Por otra parte, se ha documentado la preparación de membranas nanofibrosas a partir del electrohilado de una mezcla polimérica de PCL y gelatina (GE), a la que se incorporaron nanofibras de celulosa (CL) o nanofibras de celulosa acetilizada (ACL) [28]. Esta mezcla polimérica se preparó a una concentración de 10 %p/p de PCL/GE con una relación en peso de 7/3, usando como solvente una solución ácida AA:FA a una razón 1:3 en volumen. Además, a esta mezcla se le incorporó 1 o 2 %p de CL o ACL para su electrohilado. El electrohilado se llevó a cabo con una jeringa de 1 mL, aguja calibre 23, flujo de entre 0.1 y 0.2 mL/h, una separación entre aguja y colector (hoja de aluminio) de 13 cm y voltajes de entre 11 y 14 kV. Se obtuvieron diámetros de fibra de entre 100 y 300 nm, mismo que aumentó en relación con la incorporación de CL o ACL a la mezcla electrohilada. Con esto, propiedades mecánicas como el módulo de Young y la resistencia a la tensión aumentaron hasta 59 y 4.5 MPa, respectivamente, al incorporar 2 %p de ACL a la mezcla polimérica. Además, de acuerdo con las mediciones hechas por la técnica de ángulo de contacto, la incorporación de AC a la mezcla PCL/GE incrementó la hidrofiliidad de las membranas (ángulo de contacto de 66 °), en virtud de los grupos hidroxilo en las cadenas de celulosa. Este aumento de hidrofiliidad de las membranas tuvo un impacto significativo en la proliferación de células como los fibroblastos (L929), luego de 5 días de incubación *in vitro*.

Estos antecedentes sugieren que el uso de glicoproteínas o de polímeros naturales con abundantes grupos hidroxilo, amino, acetilo o carboxilo favorecen la proliferación *in vitro* de células sobre membranas nanofibrosas obtenidas a través de la técnica de electrohilado. En este sentido, a continuación, se plantearán las características estructurales de la CMC, a fin de establecer la viabilidad de su uso en la fabricación de andamios útiles para ingeniería de tejidos.

1.5. La carboximetil-celulosa

La CMC es un polisacárido derivado celulosa, que se obtiene de la sustitución de sus grupos hidroximetilo por carboximetilo [29, 30]. La Figura 2 muestra la estructura molecular de la celulosa y de la CMC. La sustitución de estos grupos funcionales se reporta como una cantidad llamada “grado de sustitución” (DS), que representa el número de hidroximetilos sustituidos por unidad de anhidroglucosa [29]. Es común que la CMC se encuentre como una sal de sodio (Na) (véase Figura 2), cuyos cationes son fácilmente desplazados de los grupos carboximetilo en solución acuosa [30]. Así, la CMC presenta un carácter aniónico en solución acuosa con pH superior a 4, que se pierde debido a la protonación de sus grupos carboximetilo a pH menores [30-32]. En virtud de ello, se considera a la CMC un polisacárido útil en el desarrollo de hidrogeles para la adsorción y liberación de moléculas de fármacos o colorantes, donde el “gatillo” es el cambio en pH [33-35]. Además, debido a su biocompatibilidad, ha sido utilizado en la síntesis de andamios inyectables para ingeniería de tejidos [35].

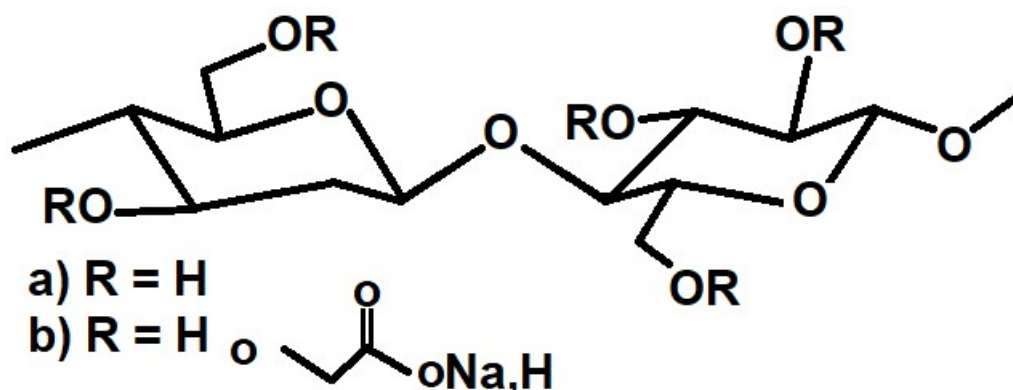


Figura 2. Estructura molecular de: (a) celulosa; (b) carboximetil-celulosa.

Asimismo, se ha evaluado la efectividad de la CMC para la adhesión de proteínas catiónicas, tales como TGF- β 1 y FGF-2, usadas como factores de crecimiento para células madre mesenquimales y fibroblastos, respectivamente [36]. En este caso, la CMC fue sulfonatada (sCMC) y

conjugada en membranas nanofibrosas basadas en poli(hidroxibutirato) / gelatina (PG), que fueron obtenidas previamente por la técnica de electrohilado. Dada la presencia de grupos carboxilo y sulfato de la sCMC, las proteínas TGF- β 1 y FGF-2 se unieron de manera exitosa a las membranas nanofibrosas PG. Más aún, la unión de FGF-2 a las membranas nanofibrosas incremento de manera significativa la proliferación de células madre mesenquimales luego de 7 días de incubación.

En consideración de lo anterior, es posible inferir la utilidad de la CMC en el desarrollo de andamios para ingeniería de tejidos. No obstante, la preparación de nanofibras de CMC a partir de técnicas como el electrohilado es difícil, dada su compleja estructura molecular. Por ello se ha propuesto el uso de polímeros tipo tensoactivo, como el PEO, a fin de optimizar el electrohilado de la CMC desde mezclas poliméricas acuosas [24]. De esta aproximación experimental se obtuvieron membranas compuestas de nanofibras con diámetro de entre 398 y 176 nm. Este diámetro disminuyó a medida que el contenido en peso de CMC en la mezcla polimérica aumentó. De acuerdo con los autores, este fenómeno se relaciona con el incremento de la conductividad de la mezcla a electrohilar, en virtud del carácter polianiónico de la CMC. Asimismo, se reportó que el módulo de Young y la resistencia a la tensión de las membranas varía de manera inversa con el contenido en peso de CMC, lo cual puede relacionarse con el diámetro de las nanofibras y la posible interconexión entre poros en las membranas. Más aún, las membranas PEO/CMC mostraron una proliferación de fibroblastos NIH 3T3, comparable con la del medio de cultivo usado como control, luego 24 horas de incubación.

Además, se ha reportado la obtención de membranas fibrosas basadas en compósitos de nanopartículas de plata (AgNPs) y CMC que fueron electrohiladas desde mezclas poliméricas acuosas con PVA [37]. Estas mezclas se prepararon usando PVA con grados de hidrólisis de 98% y 87-89% a fin de reducir su tensión superficial y conferirles la viscosidad adecuada para

obtener nanofibras PVA/CMC-AgNPs. De esta ruta se obtuvieron membranas compuestas de nanofibras libres de defectos, con un diámetro de entre 153 y 103 nm. Este diámetro varió de manera inversa con el contenido en peso de CMC en la mezcla electrohilada. Este fenómeno se relacionó con la magnitud de la conductividad, tensión superficial y viscosidad de las mezclas electrohiladas. De acuerdo con la evidencia experimental reportada, estas cantidades variaron debido a la interacción entre grupos carboximetilo de la CMC y acetilos remanentes en el PVA.

1.6. Las nanopartículas de plata

La plata es un metal seminoble con una estructura cristalina cúbica centrada en las caras (FCC), cuyo parámetro de red es de 4.08 Å. Específicamente, las AgNPs exhiben una notable actividad bactericida, misma que depende de su tamaño. En este contexto se ha reportado que las AgNPs pueden liberar iones Ag^+ en dispersiones acuosas de biopolímeros, que afectan a las bacterias de distintas maneras, ya sea interactuando con su pared celular y membrana plasmática; desnaturalizando los ribosomas para inactivar sus proteínas; o interrumpiendo la producción de trifosfato de adenosina (ATP) e inhibiendo su capacidad de replicación [38].

Se han desarrollado diferentes rutas de síntesis para la preparación de AgNPs, entre las cuales destacan las basadas en procesos físicos, químicos, biológicos y de síntesis verde. En los métodos físicos, las nanopartículas se preparan mediante una condensación-evaporación a presión constante, descargas eléctricas, pirolisis y ablación laser. Una ventaja de estos métodos es la alta velocidad de la reacción. Además, técnicas tales como la ablación laser permiten la obtención de nanopartículas “limpias” de agentes químicos a nivel superficial [39, 40].

El uso de extractos de plantas, bacterias, hongos y algas como agentes reductores para la preparación de AgNPs son comúnmente entendidos como síntesis verde, ya que generalmente no usan o producen sustancias peligrosas para la salud humana y el medio ambiente [41]. Más aún, son métodos fácilmente escalables para la producción en masa, así como mucho más económicos que aquellos que implican procesos físicos. Así, se han utilizado biomoléculas como alcaloides, flavonoides, aminoácidos, fenoles o carbohidratos como agentes reductores y estabilizadores para el control del tamaño de partícula.

Además, se ha reportado la obtención de AgNPs a partir de una ruta de síntesis verde que usa a la CMC como agente reductor y estabilizador [42]. De acuerdo con los autores, a través de esta ruta es posible obtener compósitos basados en AgNPs inmovilizadas en CMC, cuyo tamaño de partícula varía entre 13 y 44 nm. Este tamaño cambia de acuerdo con la relación en peso de CMC/AgNO₃ usada para la síntesis del compósito, así como de la estructura molecular del CMC. Más aún, debido a la inmovilización de las AgNPs en CMC, fue posible regular la actividad bactericida contra *E. faecalis* (ATCC 29212), sin inducir toxicidad significativa en cultivos *in vitro* de fibroblastos gingivales (ATCC PCS-201-018) luego de 1 día de incubación.

1.7. Hipótesis y objetivo general

1.7.1. Hipótesis

El electrohilado de mezclas poliméricas acuosas de alcohol polivinílico y compósitos basados en nanopartículas de plata inmovilizadas en carboximetilcelulosa, permitirá la obtención de membranas nanofibrosas cuya morfología, actividad bactericida y biocompatibilidad les confieran una potencial aplicación en la ingeniería de tejidos.

1.7.2. Objetivo General

Desarrollar membranas nanofibrosas con potenciales aplicaciones en la ingeniería de tejidos, a partir del electrohilado de mezclas poliméricas acuosas de alcohol polivinílico y compósitos basados en nanopartículas de plata inmovilizadas en carboximetil-celulosa.

CAPÍTULO 2.

EXPERIMENTACIÓN

2.1. Introducción

En presente trabajo de investigación se desarrollaron membranas nanofibrosas basadas en nanofibrosas de alcohol polivinílico (PVA) y compósitos de nanopartículas de plata (AgNPs) inmovilizadas en carboximetil-celulosa (CMC). La preparación de estas membranas se llevó a cabo por una ruta de tres pasos, que involucran: (1) síntesis verde de compósitos CMC-AgNPs; (2) preparación de mezclas poliméricas acuosas de CMC-AgNPs/PVA; y (3) electrohilado de dichas mezclas para la obtención de membranas nanofibrosas.

En este capítulo se presentará a detalle la metodología seguida para la preparación de las membranas CMC-AgNPs/PVA. Luego, se expondrá el protocolo de caracterización seguido para el estudio de su morfología, composición química, propiedades mecánicas, actividad bactericida y viabilidad celular. En la Figura 3, se muestra un diagrama en bloque de la metodología seguida en este trabajo.

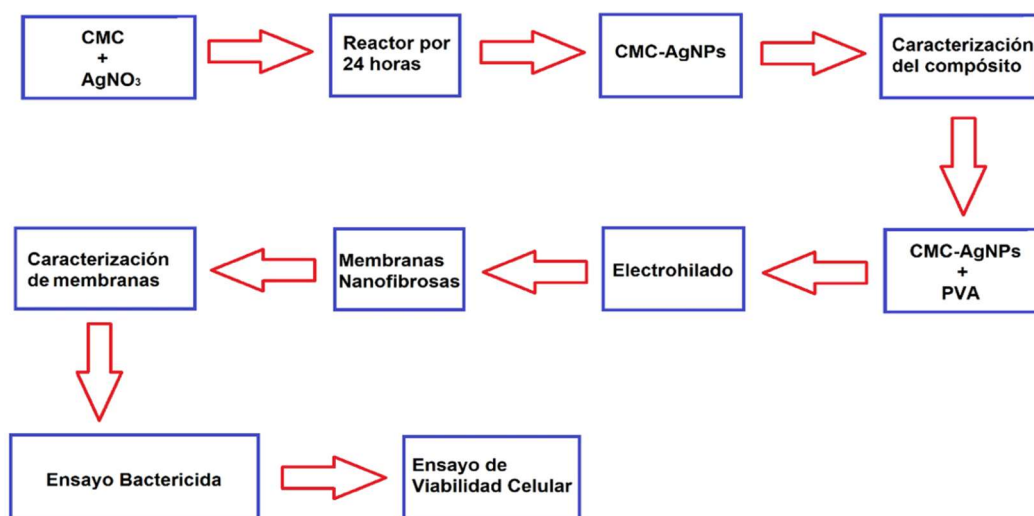


Figura 3. Diagrama en bloque de la metodología experimental.

2.2. Síntesis de compósitos CMC-AgNPs.

2.2.1. Materiales

Para la síntesis del compósito CMC-AgNPs se usó CMC con un grado de sustitución $DS = 1.2$ y peso molecular $M_w = 250$ kDa, así como nitrato de plata ($AgNO_3$), que fueron adquiridos con la compañía Sigma-Aldrich y usados tal como se recibieron. Para la preparación de las soluciones empleadas en la síntesis del compósito, se utilizó agua desionizada ($\rho = 18$ M Ω -cm).

2.2.2. Metodología de síntesis

La síntesis del compósito CMC-AgNPs se llevó a cabo siguiendo la metodología reportada por Martínez-Rodríguez y colaboradores [42], con algunas modificaciones, tal y como se describe a continuación:

1. Preparar una solución de CMC con concentración de 15 mg/mL, disolviendo 1.5 g de CMC en agua desionizada y aforando a 100 mL.
2. Preparar una solución de $AgNO_3$ con concentración de 9.64 mg/mL, disolviendo 96.4 mg de $AgNO_3$ en agua desionizada y aforando a 10 mL.
3. Preparar una solución de $AgNO_3$ a una concentración de 0.24 mg/mL, diluyendo en agua desionizada 2.5 mL de la solución preparada en el paso anterior y aforando a 10 mL.
4. Agregar 20 mL de solución de CMC en un matraz de tres bocas (reactor) bajo condiciones de agitación constante a temperatura ambiente.
5. Agregar 10 mL de la solución $AgNO_3$ con concentración de 0.24 mg/mL al reactor y agitar la mezcla a temperatura ambiente.
6. Incrementar la temperatura de la solución resultante del paso anterior a 90°C y mantener la reacción a esta temperatura bajo condiciones de reflujo constante de agua fría durante 1 día.

7. Enfriar de manera natural hasta alcanzar la temperatura ambiente, para posteriormente congelar la solución resultante con hielo seco (CO_2 sólido); y secar el material mediante liofilización.
8. Pesar el material resultante y preparar una dispersión acuosa de compósito de CMC-AgNPs a una concentración de 53 mg/mL agregando 530 mg de compósito en agua desionizada y aforando a 10 mL, cuya relación en peso CMC/AgNPs es de 200.
9. Almacenar la dispersión en un recipiente opaco para su posterior caracterización y uso.

2.3. Preparación de membranas nanofibrosas

2.3.1. Materiales

Para la preparación de las membranas nanofibrosas se utilizó PVA de bajo peso molecular (LMA), con un peso molecular de $M_w = 13 - 23$ kDa y grado de hidrólisis de 87.8 %, PVA de alto peso molecular (HMP) con $M_w = 130$ kDa y grado de hidrólisis de 99.6 %, que fueron adquiridos con la compañía Sigma-Aldrich y usados tal como se recibieron; y el compósito CMC-AgNPs. Además, se usó agua desionizada ($\rho = 18 \text{ M}\Omega\text{-cm}$) para obtención de las soluciones necesarias en la preparación de estas membranas. Las membranas fueron obtenidas mediante la técnica de electrohilado, usando una fuente de alta tensión DC marca Gamma High Voltage Research Inc. y una bomba de infusión marca New Era Pump System Inc.

2.3.2. Metodología de preparación

La preparación de las membranas nanofibrosas se condujo de acuerdo con la metodología reportada por Martínez-Rodríguez y colaboradores [37], con varias modificaciones, a saber:

1. Preparar una solución acuosa de alcohol polivinílico (PVA) a una concentración de 100 mg/mL, a partir de la disolución en agua desionizada de una mezcla de LMP y HMP con una relación en peso LMP/HMP = 1.
2. Mezclar la solución preparada en el paso anterior con una dispersión acuosa del compuesto CMC-AgNPs de concentración 53 mg/mL, a las relaciones en peso CMC-AgNPs/PVA indicadas en la Tabla I a fin de obtener, mediante agitación magnética, aproximadamente 10 mL de las mezclas poliméricas mostradas en la Figura 4.

Tabla I. Muestras de membranas nanofibrosas preparadas.

Nombre de la muestra	Relación en volumen PVA:CMC-AgNPs	Relación en peso CMC-AgNPs/PVA	Relación en peso g AgNPs/ g Membrana
M91	9:1	0.06	2.8×10^{-4}
M82	8:2	0.13	5.9×10^{-4}
M73	7:3	0.23	9.3×10^{-4}
M64	6:4	0.35	1.4×10^{-3}
M55	5:5	0.53	1.7×10^{-3}

3. Introducir la mezcla polimérica en una jeringa de 3 mL con una aguja de punta plana de calibre 20.
4. Electrohilar por al menos 6 horas la mezcla polimérica a temperatura ambiente y humedad relativa de entre 40-50%, aplicando voltaje de 10 kV entre la punta de la aguja y el colector de las nanofibras (hoja de aluminio); a una distancia entre punta y colector de exactamente 8 cm; y un flujo de mezcla polimérica de 1 μ L/min. Es importante mencionar que también se electrohiló la solución acuosa PVA usando las condiciones antes mencionadas para obtener la muestra denominada MPVA.
5. Retirar del colector la membrana obtenida para su posterior caracterización (véase Figura 5).



Figura 4. Fotografía de las mezclas poliméricas preparadas a las relaciones en volumen PVA:CMC-AgNPs indicadas en cada vial.

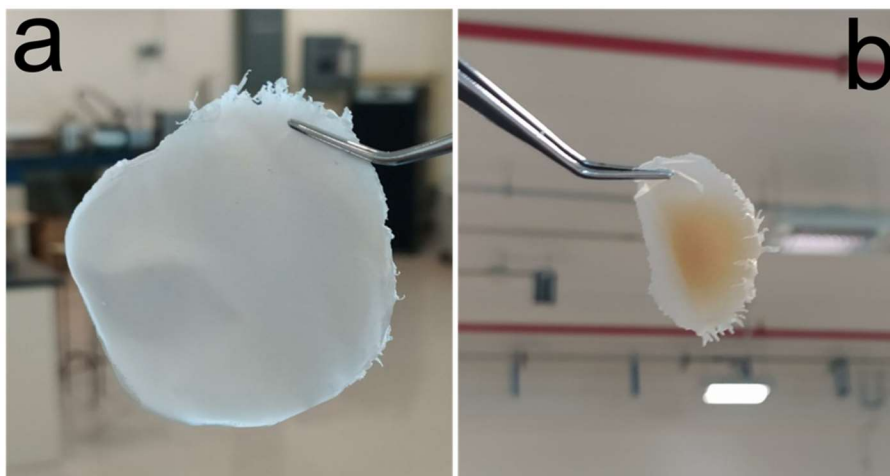


Figura 5. Fotografía en la que se ilustra, a manera de ejemplo, las membranas obtenidas mediante el proceso de electrohilado: (a) M91; (b) M55.

2.4. Caracterización de las muestras sintetizadas

2.4.1. Caracterización del compuesto CMC-AgNPs

La caracterización morfológica y cristalina del compuesto CMC-AgNPs se realizó por microscopía electrónica de transmisión (TEM), en un microscopio de emisión de campo (FEG) marca FEI, modelo Titan G2 80-300, usando las técnicas de campo oscuro anular de ángulo amplio (HAADF-STEM), campo claro (BF) y difracción de electrones de área selecta (SAED). Se obtuvo la distribución de tamaño de partícula a partir de la medición de al menos 300 partículas, que fueron seleccionadas aleatoriamente, y su posterior análisis usando el modelo estadístico de Gauss. La preparación del espécimen

analizado se logró colocando un alícuota de una dispersión acuosa diluida del compósito CMC-AgNPs sobre una rejilla de Cu recubierta con carbón amorfo (lacey-C Cu-grid). La rejilla fue secada bajo condiciones ambiente durante 1 hora para su posterior análisis.

La caracterización estructural se realizó por espectroscopia de infrarrojo en un espectrómetro marca Perkin Elmer, modelo Frontier MIR FT-IR. La muestra de compósito liofilizado fue medida por la técnica de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR). Finalmente, la composición química del compósito liofilizado fue estudiada por la técnica de espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) en un espectrómetro marca Thermo Fisher Scientific, modelo K-alpha, con radiación monocromática de $K\alpha$ -Al ($E = 1.5 \text{ keV}$).

2.4.2. Caracterización de las membranas nanofibrosas

La caracterización morfológica de las membranas nanofibrosas se hizo por microscopia electrónica de barrido en un microscopio marca FEI, modelo Nova NanoSEM, a través de la técnica de imagen por electrones secundarios (SE) en condiciones de bajo vacío. Se obtuvo la distribución de diámetro de fibra mediante la medición de al menos 300 nanofibras, que fueron seleccionadas aleatoriamente, y su posterior análisis usando el modelo estadístico de Gauss. Asimismo, la caracterización estructural y química fueron conducidas por las técnicas espectroscópicas de ATR-FTIR y XPS, respectivamente.

Por último, las propiedades mecánicas de resistencia a la tensión, deformación a fractura y módulo de Young de las membranas nanofibrosas fueron determinadas a través de ensayos de tensión, usando una celda de carga de 30 kg y una rapidez de desplazamiento de las mordazas de 10.8 mm/min, en una máquina para ensayos mecánicos marca Stable Micro Systems, modelo TA.XTplus. Para ello, se prepararon especímenes con una longitud de 30 mm, que fueron cortados con forma de “hueso de perro” (véase la Figura 6), desde

membranas con un espesor de entre 150 y 200 μm . Estos especímenes fueron sometidos a ensayo de tensión usando una distancia entre mordazas y ancho de 16 y 5 mm, respectivamente. Las propiedades mecánicas de las membranas nanofibrosas fueron obtenidas a través del ensayo de 5 especímenes de cada membrana (conjunto experimental, $n = 5$). Se utilizó estadística descriptiva para el cálculo de la media y desviación estándar de los datos obtenidos.

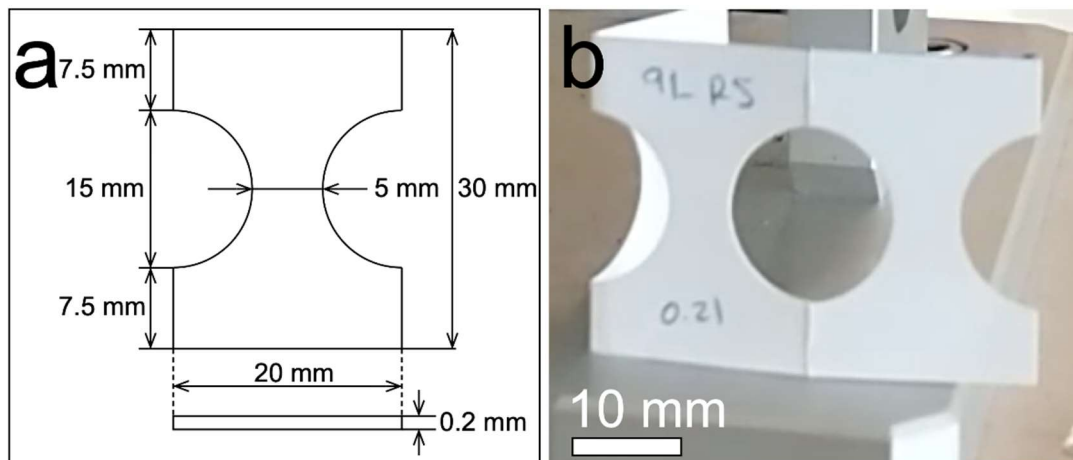


Figura 6. Imágenes en las que se muestra: (a) dimensiones de los especímenes preparados para los ensayos de tensión; (b) fotografía de los especímenes preparados para los ensayos de tensión.

2.4.3. Ensayo bactericida

Para determinar la actividad bactericida de las membranas preparadas se realizaron ensayos contra las bacterias Gramnegativa *Escherichia coli* (ATCC BAA-2471) (*E. coli*) y Grampositiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 33592) (*S. aureus*), mediante la técnica de contacto directo reportada por Weiss y colaboradores [43], con algunas adecuaciones. Esta prueba se llevó a cabo con la finalidad de elucidar la habilidad de las membranas para lidiar con la viabilidad celular de los microorganismos que se encuentran en contacto con su superficie. En una microplaca de 96 pozos se colocaron, por quintuplicado, especímenes circulares de 5 mm de diámetro que fueron cortados de las membranas nanofibrosas y fijados cuidadosamente en el fondo de cada pozo.

Luego, se inocularon sobre las membranas 10 μ L de una suspensión de bacterias (*E. coli* o *S. aureus*) en caldo nutritivo (Dibico 1040) con 1×10^6 células viables. Esta suspensión se dejó en contacto con los especímenes por 30 s (véase estándar NMX-BB-040-SCFI-1999), para luego ser transferida a pozos con 215 μ L de caldo nutritivo estéril. Se obtuvieron 5 cultivos de bacterias por espécimen (conjunto experimental, $n = 5$). Estos cultivos fueron homogenizados por 2 minutos usando un agitador orbital, para luego ser incubados a 37 °C durante 1 día en una atmósfera aeróbica.

Para este ensayo se utilizaron como controles negativos los cultivos de las bacterias (*E. coli* o *S. aureus*) que no estuvieron en contacto con los especímenes, y el caldo nutritivo estéril como control positivo, respectivamente. Luego de 1 día de incubación, se estimó la cantidad de bacterias viables en los cultivos a partir de la medición de su absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Para ello, se utilizó un espectrómetro para microplacas marca Bio-Rad laboratories, modelo iMark Microplate Reader. Se empleó estadística descriptiva para el cálculo de la media y desviación estándar de los datos obtenidos. Además, se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para el análisis estadístico de estos datos. Para este estudio, los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

2.4.4.. Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular de las membranas nanofibrosas se evaluó usando como modelo a las células de Schwann (ATCC CRL-3390); utilizando el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) como indicador de viabilidad (ensayo MTT). Para ello, la línea celular fue cultivada en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de FBS, 1% de antibiótico-antimicótico (también llamado DMEM-completo) a 37 °C en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 90 %.

Posteriormente, se colocaron, por triplicado (conjunto experimental, $n = 3$), especímenes circulares de 5 mm de diámetro de las membranas preparadas en cada pozo de una microplaca de 96 pozos. A continuación, se inocularon sobre las membranas 100 μ L de DMEM-completo con 5×10^4 células viables. Estos cultivos fueron incubados a 37 °C por 1 o 5 días en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂. Para este ensayo se utilizaron como controles positivo y negativo 100 μ L de medio DMEM-completo con 5×10^4 células viables y 100 μ L de medio DMEM-completo, respectivamente.

Luego de la incubación por 1 o 5 días, se descartó el sobrenadante en los cultivos y las células fueron lavadas cuidadosamente con PBS. Después se agregaron 100 μ L de una dilución de MTT en DMEM-completo al 5 mg/mL a cada uno de los pozos en la microplaca, para luego ser incubados por 4 horas. Transcurrido este periodo, se descartó el sobrenadante en cada pozo y se disolvieron los cristales de formazan con 200 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO). Finalmente, la absorbancia de cada cultivo fue medida a una longitud de onda de 595 nm usando un espectrómetro para microplacas (Bio-Rad laboratories, modelo iMark Microplate Reader). Se empleó estadística descriptiva y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para el análisis estadístico de los datos obtenidos. Para este estudio, los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

CAPÍTULO 3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Introducción

En este capítulo se expondrán y discutirán los resultados obtenidos de la caracterización de los nanomateriales sintetizados, de acuerdo con la metodología experimental que se siguió en este trabajo de investigación (véase Figura 3). Primeramente, se detallará la evidencia experimental recabada de la caracterización morfológica y cristalina del compuesto CMC-AgNPs usado en la preparación de las membranas nanofibrosas. Posteriormente se expondrán las características estructurales y composición química de dicho compuesto. Luego, se abordarán los resultados obtenidos de la caracterización morfológica de las membranas nanofibrosas preparadas a partir del electrohilado de mezclas poliméricas acuosas CMC-AgNPs/PVA. Asimismo, se detallará la evidencia experimental obtenida de su caracterización espectroscópica. Además, se describirán las propiedades mecánicas obtenidas para las membranas nanofibrosas mediante ensayos de tensión. Finalmente, se expondrán los resultados derivados de los ensayos bactericida y de viabilidad celular realizados para la evaluación de las membranas nanofibrosas.

3.2. Caracterización morfológica y cristalina del compuesto CMC-AgNPs

La Figura 7 ilustra los resultados obtenidos de la caracterización morfológica y cristalina del compuesto CMC-AgNPs. La Figura 7a muestra una imagen HAADF-STEM en donde es posible observar la morfología de las nanopartículas sintetizadas. Como se ilustra en la Figura 7b, estas nanopartículas tienen una distribución de tamaño centrada en 10.5 nm, así como una desviación estándar de ± 2.1 nm. Esta distribución de tamaño es congruente con la obtenida por rutas de química verde previamente reportadas [42]. Asimismo, la Figura 7c muestra una imagen BF obtenida a alta

magnificación en la que es posible identificar un arreglo atómico regular, cuyo espaciamiento interplanar es de 2.3 Å. Este espaciamiento concuerda con el reportado para planos de la familia {111} de la plata (Ag). Más aún, en el patrón SAED reportado en la Figura 7d se reconocen anillos de Debye relacionados con las familias de planos {111}, {200} y {220}, que concuerdan con los reportados para la estructura FCC de Ag (véase JCPDS: 04-0783). Esta evidencia confirma la formación de AgNPs en la muestra.

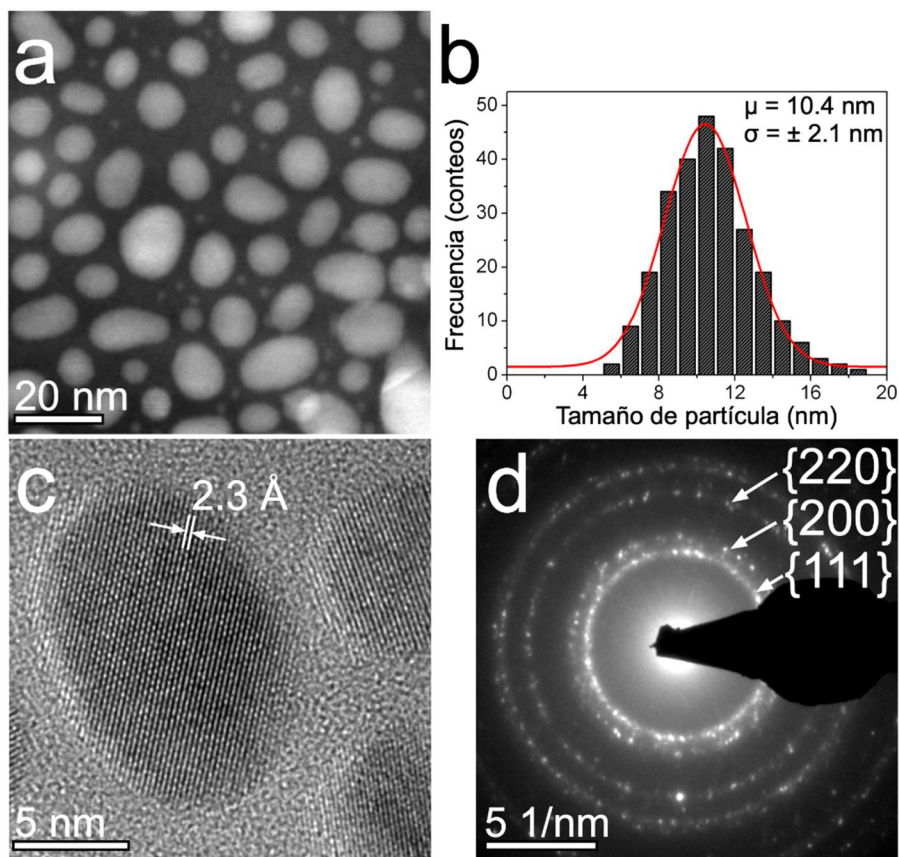


Figura 7. Caracterización morfológica y cristalina del compuesto CMC-AgNPs, en donde se muestra: (a) imagen de HAADF-STEM; (b) distribución de tamaño de partícula; (c) imagen BF obtenida en alta magnificación para una nanopartícula; y (d) patrón SAED indexado.

3.3. Caracterización estructural y química del compuesto CMC-AgNPs

En la Figura 8 se muestran los espectros ATR-FTIR obtenidos para el reactivo CMC y para el compuesto CMC-AgNPs. En el espectro del reactivo CMC se observan bandas de absorción relacionadas con [32, 44] (véase Figura 8a):

estiramiento de O-H en grupos hidroxilo a 3358 cm^{-1} ; estiramiento asimétrico del enlace C-H en metilenos y metilos a 2914 y 2881 cm^{-1} , respectivamente; estiramiento asimétrico y simétrico del enlace O-C=O en los grupos carboximetilo a 1587 y 1414 cm^{-1} , respectivamente; flexión de los enlaces C-CH y O-CH en los grupos carboximetilo a 1323 cm^{-1} ; y estiramiento del enlace C-O-C en los grupos carboximetilo a 1103 y 1049 cm^{-1} . Asimismo, en la Figura 8b, el espectro obtenido para el compuesto CMC-AgNPs muestra las bandas mencionadas anteriormente, aunque las relacionadas con el estiramiento del enlace C-O-C en los grupos carboximetilo denotan un ligero corrimiento batocrómico e hipsocrómico hacia 1097 y 1053 cm^{-1} , respectivamente, que sugiere al menos una interacción física entre dichos grupos y la superficie de las AgNPs [44, 45]. A fin de obtener más información acerca de esta interacción, se procedió a la medición de los espectros de XPS del reactivo CMC y compuesto CMC-AgNPs.

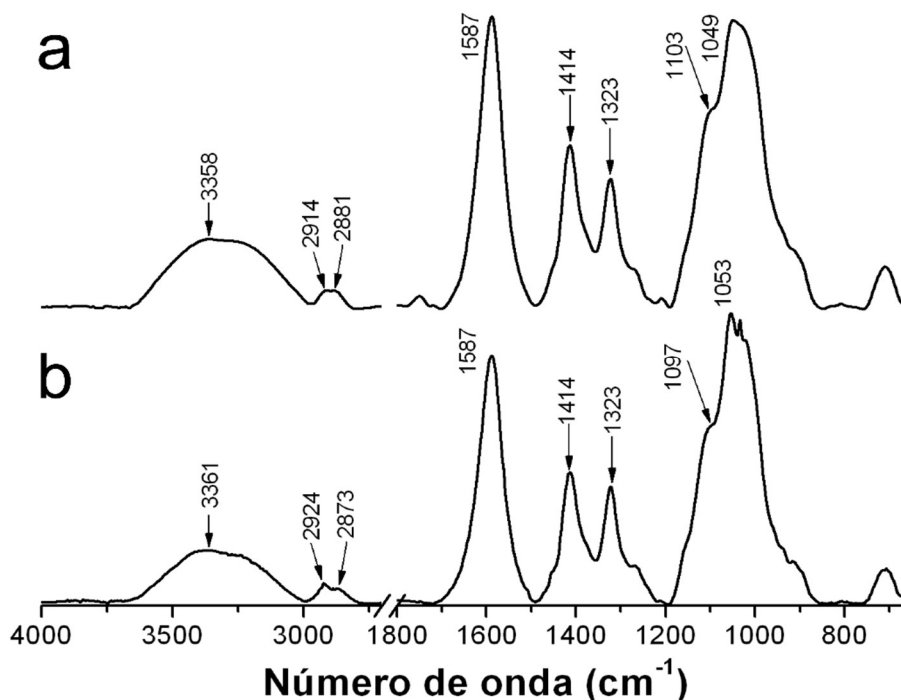


Figura 8. Espectros ATR-FTIR obtenidos para: (a) reactivo CMC; y (b) compuesto CMC-AgNPs.

La Figura 9 ilustra los espectros XPS de alta resolución C1s, O1s y Ag3d obtenidos para la CMC y el compuesto CMC-AgNPs. Estos espectros experimentales fueron deconvolucionados usando una aproximación gaussiana y una anchura a media altura (FWHM) de 1.48 eV en el software PeakFit4.12. Al respecto, el espectro C1s de la CMC se deconvolucionó en cuatro picos relacionados con C en C-C/C-H, C-O, C=O y O-C=O a 284.6, 286.3, 287.9 y 289.4 eV, respectivamente (véase Figura 9a) [46]. Asimismo, su espectro O1s muestra picos a 531.0, 532.3 y 532.9 eV atribuibles a fotoelectrones emitidos de O en C=O, C-O y O-C=O, respectivamente [46]; así como una señal a 535.3 eV, atribuible a electrones Auger de Na [47] (véase Figura 9a). Estos resultados concuerdan con los reportados por otros autores para la estructura molecular de la CMC [48] (véase Figura 9b).

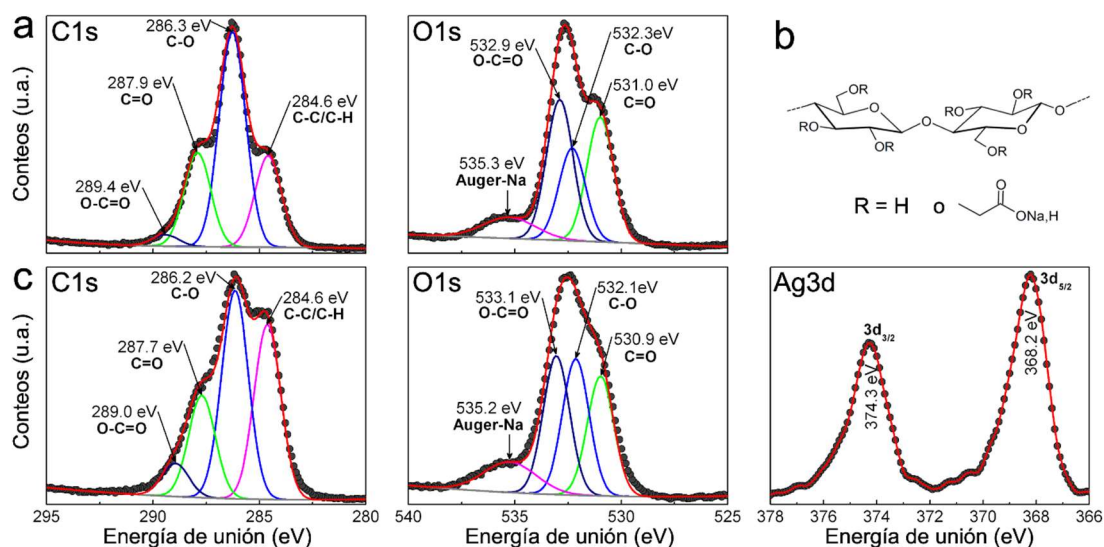


Figura 9. Imagen en donde se ilustran: (a) espectros C1s y O1s obtenidos para el reactivo CMC; (b) estructura molecular del reactivo CMC; y (c) espectros C1s, O1s y Ag3d medidos para el compuesto CMC-AgNPs.

Además, la Figura 9c muestra los espectros C1s, O1s y Ag3d medidos para el compuesto CMC-AgNPs. En el espectro C1s se observan señales relacionadas con C en C-C/C-H, C-O, C=O y O-C=O a 284.6, 286.2, 287.7 y 289.0 eV, respectivamente [46]. Por su parte, en el espectro O1s se identifican picos a 530.9, 532.1, 533.1 eV atribuibles a O en C=O, C-O y O-C=O, respectivamente, así como un pico a 535.2 eV, que corresponde a electrones

Auger de Na [47]. Estas señales son congruentes con las obtenidas para el reactivo CMC, aunque las relacionadas con C=O/C-O-C y O-C=O denotan un corrimiento hacia menores energías de hasta 0.4 eV. Más aún, el espectro Ag3d muestra dos picos a 368.2 y 374.3 eV, asociados con la emisión de fotoelectrones desde los estados 3d_{5/2} y 3d_{3/2}, respectivamente [49]; y cuya diferencia en energía es muy cercana a la esperada para Ag⁰ (6 eV) [50]. De acuerdo con la literatura consultada, estos resultados indican que las AgNPs sintetizadas están inmovilizadas en la CMC a través de enlaces de coordinación con sus grupos carboximetilo [49, 50]. Estos resultados y los obtenidos por la técnica de ATR-FTIR confirman que el proceso propuesto permite la obtención de un material compuesto CMC-AgNPs.

3.4. Caracterización morfológica de las membranas nanofibrosas

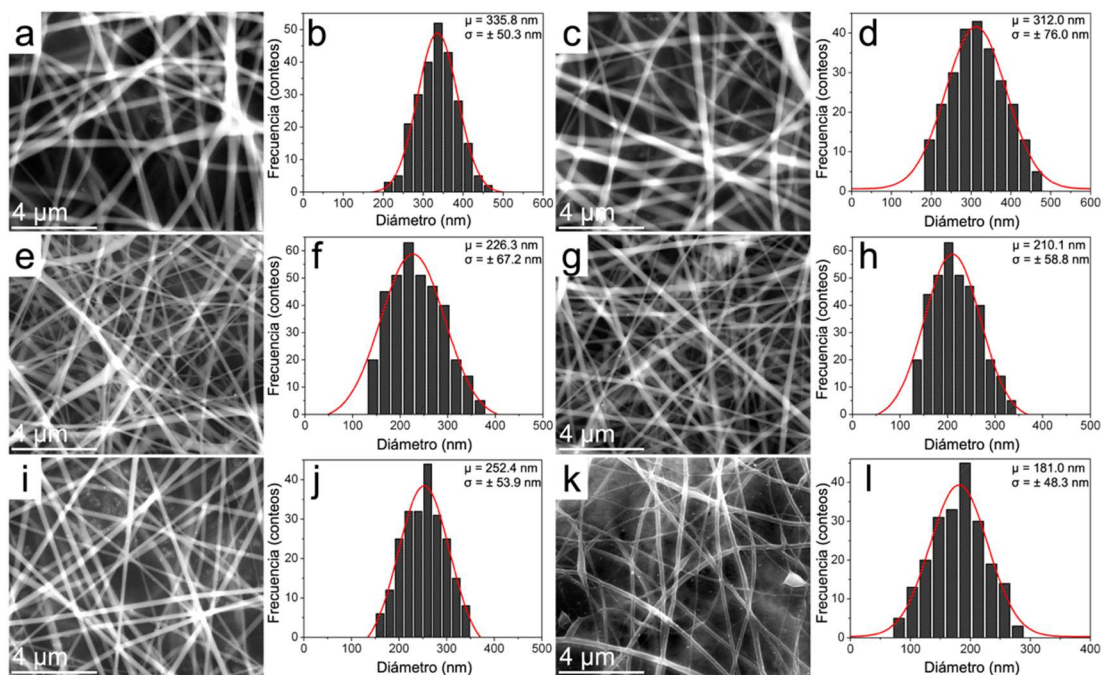


Figura 10. Caracterización morfológica de las membranas nanofibrosas, en donde se muestran imágenes de SEM por la técnica de SE y distribución de diámetro de fibra obtenidas, respectivamente, para: (a) y (b) MPVA; (c) y (d) M91; (e) y (f) M82; (g) y (h) M73; (i) y (j) M64; (k) y (l) M55.

La Figura 10 ilustra los resultados obtenidos de la caracterización morfológica de las membranas nanofibrosas preparadas. Como se observa, la morfología de las nanofibras se encuentra libre de defectos en todos los casos. Asimismo,

de acuerdo con la medición de diámetro de fibra y su posterior análisis, el centro de la distribución de dicho diámetro se mueve hacia valores menores al aumentar el contenido en peso de CMC-AgNPs en la mezcla polimérica electrohilada. Esta tendencia se cumple para casi todas las muestras, con excepción de M64, aunque el centro de su distribución continúa siendo menor al obtenido para MPVA. Más aún, en las imágenes obtenidas se puede apreciar la dispersión de AgNPs sobre las nanofibras electrohiladas. A fin de indagar acerca del origen de este comportamiento, se procedió a medir estas muestras por la técnica de ATR-FTIR.

3.5. Caracterización espectroscópica de las membranas nanofibrosas

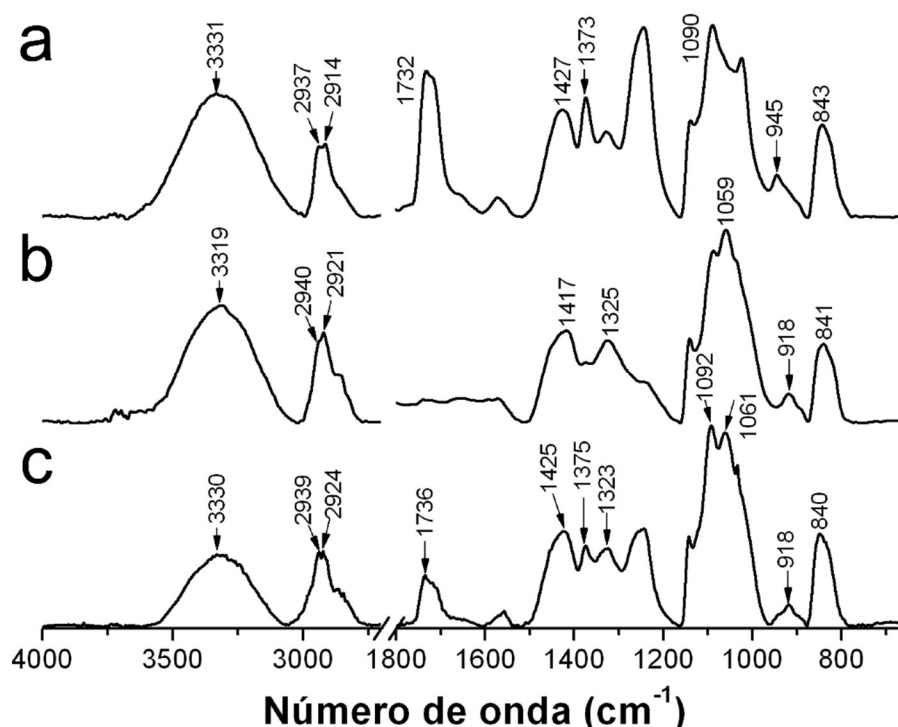


Figura 11. Espectros ATR-FTIR obtenidos para: (a) reactivo LMP; (b) HLP; y (c) MPVA.

La Figura 11 muestra los espectros de ATR-FTIR obtenidos para los reactivos LMP y HMP, así como de la membrana MPVA. En el espectro de la Figura 11a se observan bandas de absorción atribuibles a vibraciones en grupos del LMP, como lo son [51, 52]: estiramiento de O-H en grupos hidroxilo a 3331 cm^{-1} ; estiramiento asimétrico de C-H en metilenos y metilos a 2937 y 2914 cm^{-1} ,

respectivamente; estiramiento de C=O en grupos acetilo a 1732 cm^{-1} ; flexión en el plano del enlace C-O-H a 1427 cm^{-1} ; flexión de enlace C-H en metilenos a 1373 cm^{-1} ; estiramiento del enlace C-O a 1090 cm^{-1} ; flexión fuera del plano del enlace C-O-H a 945 cm^{-1} ; y estiramiento del enlace C-C en cadena alifática a 843 cm^{-1} .

Estas bandas también son visibles en el espectro obtenido para el HMP, a excepción de la relacionada con el estiramiento de C=O, lo cual se debe a que el grado de hidrólisis de este reactivo es del 99.6 % (véase Figura 11b). Asimismo, en el espectro obtenido para MPVA se observa un ligero corrimiento hipsocrómico de las bandas relacionadas con los estiramientos de enlaces C=O y C-O (véase Figura 11c). Esto sugiere interacciones intramoleculares tipo puente de hidrógeno entre las cadenas de ambos polímeros.

La Figura 12 muestra los espectros ATR-FTIR obtenidos para las membranas CMC-AgNPs/PVA. En todos los casos se observan bandas de absorción relacionadas con los modos de vibración previamente identificados para los reactivos CMC, LMP y HMP (véase Figuras 8 y 11). No obstante, es importante hacer notar que la banda relacionada con el estiramiento asimétrico O-C=O del grupo carboxilo en la CMC aumenta en intensidad en relación directa con el contenido en peso de CMC-AgNPs en la mezcla electrohilada. Lo anterior se determinó tomado como referencia las bandas asociadas con el estiramiento asimétrico del enlace C-H a 2940 cm^{-1} . Más aún, esta banda denota un corrimiento hipsocrómico desde 1587 cm^{-1} , para el reactivo CMC (véase Figura 8a), hasta 1599 cm^{-1} (véase Figura 12d). Asimismo, se observan corrimientos hipsocrómicos y batocrómicos para las bandas atribuidas a los estiramientos de enlaces C=O y C-O. Esto sugiere interacciones tipo puente acetal y/o de hidrógeno entre grupos carboximetilo, acetilo e hidroxilo. Tal como se ha reportado previamente, este tipo de interacciones regulan la hilabilidad de este tipo de mezclas poliméricas, confiriéndoles una viscosidad

y tensión superficial adecuadas para la obtención de nanofibras delgadas y libres de defectos [37].

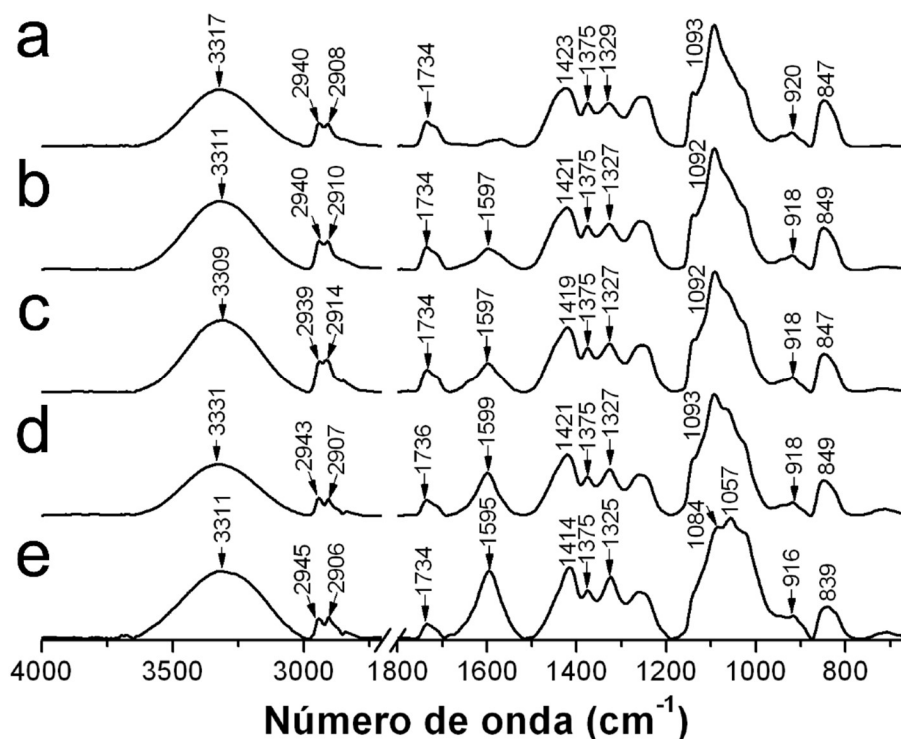


Figura 12. Espectros ATR-FTIR obtenidos para: (a) M91; (b) M82; (c) M73; (d) M64; y (e) M55.

A fin de obtener más evidencia experimental a cerca de esta interacción, se procedió al estudio por XPS del estado químico de C y O para las membranas MPVA y M64. Los espectros C1s y O1s de MPVA y M64 fueron deconvolucionados usando una aproximación gaussiana y un FWHM de entre 1.48 y 2.46 eV, como se sugiere en la literatura consultada [48, 53, 54]. La Figura 13 muestra los espectros C1s y O1s obtenidos para estas muestras, en donde se pueden identificar señales relacionadas con fotoelectrones emitidos desde C en C-H/C-C, C-O y C=O a 284.6, 286.0 y 288.4 eV, respectivamente, para MPVA (véase Figura 13a). Asimismo, el espectro O1s muestra picos a 532.2, 532.6 y 534.1 eV, relacionados con O en C=O, C-O y de agua adsorbida, respectivamente (véase Figura 13a). Estas señales son congruentes con las reportadas por diversos autores para el PVA con distintos grados de hidrólisis [53, 54]. Estas señales también son visibles en los

espectros C1s y O1s obtenidos para M64, junto con las atribuidas a C y O en O-C=O a 289.4 y 533.4 eV, respectivamente (véase Figura 13b). No obstante, las relacionadas con C-O y C=O denotan corrimientos de 0.1 y 0.2 eV en el espectro C1s, y de 0.3 y 0.6 eV en el espectro O1s, de M64, respectivamente. Este resultado apunta a que la interacción entre grupos carboximetilo, acetilo e hidroxilo de la CMC y PVA son la fuente que le confiere a las mezclas poliméricas una buena hilabilidad.

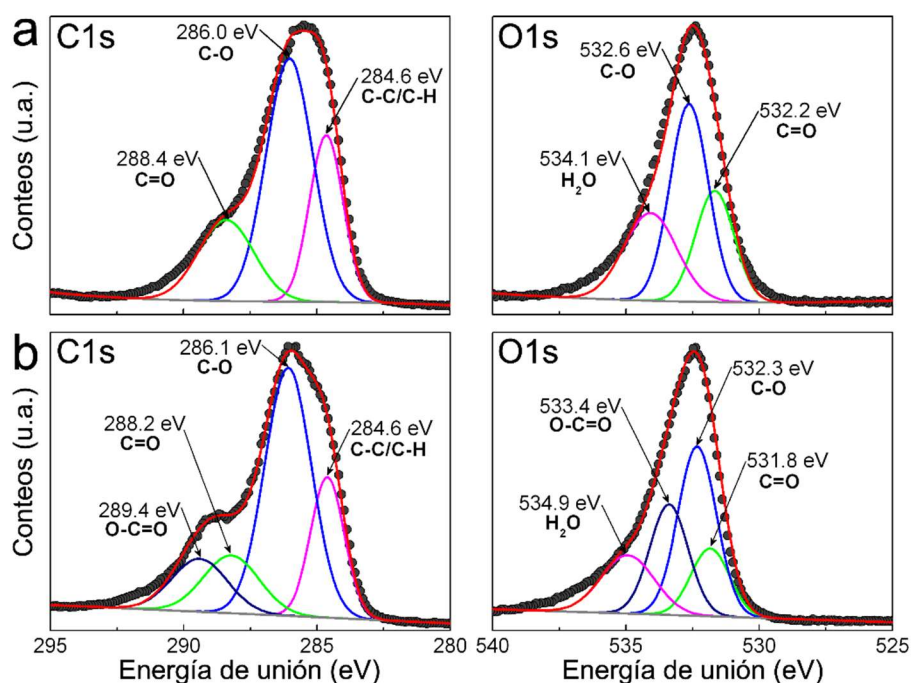


Figura 13. Espectros C1s y O1s obtenidos por XPS para las membranas nanofibrosas: (a) MPVA; y (b) M64.

3.6. Caracterización mecánica de las membranas nanofibrosas

En consideración de la morfología obtenida para las membranas electrohiladas (véase Figura 10), se procedió a la medición de propiedades mecánicas tales como resistencia a la tensión, deformación a fractura y módulo de Young de especímenes de MPVA, M91, M82 y M73. La Figura 14 ilustra las curvas esfuerzo-deformación típicas obtenidas para estas membranas nanofibrosas. Asimismo, la Tabla II muestra las propiedades mecánicas medidas de cada

conjunto experimental ($n = 5$). Además, en esta tabla se incluyen la media y desviación estándar obtenidas de la medición de su diámetro de fibra.

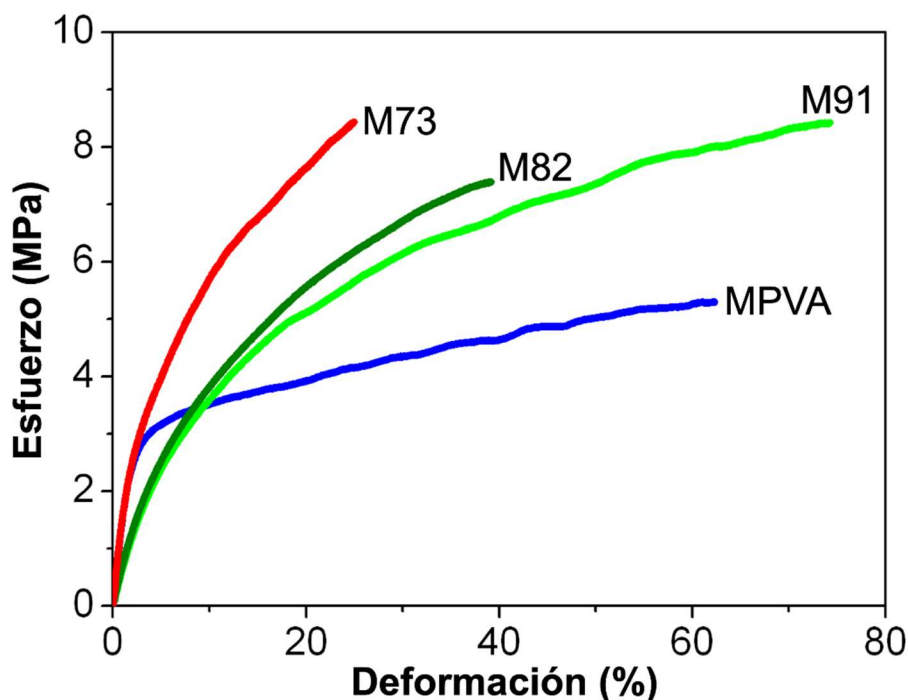


Figura 14. Curvas esfuerzo-deformación obtenidas para las membranas nanofibrosas indicadas.

De acuerdo con estos datos, al incrementar el contenido de CMC-AgNPs en la mezcla electrohilada, la resistencia a la tensión aumenta desde 5.8 ± 0.7 MPa, obtenida para MPVA, hasta 8.1 ± 0.3 MPa para M73 (véase Tabla II). No obstante, para este mismo caso, la deformación a la fractura y el módulo de Young disminuye a valores de 24.1 ± 1.2 % y 162.8 ± 28.3 MPa, respectivamente (véase Tabla II). Este comportamiento es congruente con el reportado para otras mezclas poliméricas que incluyen celulosa y acetato de celulosa [18, 55]. Más aún, basados en la evidencia experimental recabada en este trabajo de tesis, el incremento en la rigidez de las membranas nanofibrosas puede estar relacionado con la disminución del diámetro de las nanofibras, así como en la interacción entre las moléculas de CMC y PVA.

Tabla II. Diámetro de nanofibras y propiedades mecánicas obtenidos de las membranas nanofibrosas. Los datos se expresan en media $\pm$ desviación estándar.

Muestra	Diámetro de nanofibras (nm)	Resistencia a la tensión (MPa)	Deformación a la fractura (%)	Módulo de Young (MPa)
MPVA	335.8 $\pm$ 50.3	5.8 $\pm$ 0.7	55.7 $\pm$ 8.9	194.6 $\pm$ 46.3
M91	312.0 $\pm$ 76.0	8.5 $\pm$ 0.3	73.6 $\pm$ 9.4	106.1 $\pm$ 67.6
M82	226.3 $\pm$ 67.2	6.5 $\pm$ 1.5	33.1 $\pm$ 17.8	93.3 $\pm$ 33.2
M73	210.1 $\pm$ 58.8	8.1 $\pm$ 0.3	24.1 $\pm$ 1.2	162.8 $\pm$ 28.3

Es importante mencionar que una descripción más precisa a cerca del origen de este incremento en la rigidez de las membranas queda fuera del alcance de este trabajo de investigación. No obstante, es posible decir que las propiedades mecánicas de estas membranas son equiparables a las reportadas para andamios útiles en la regeneración de tejidos del sistema nervioso, tales como las células de Schwann [8, 56].

3.7. Actividad bactericida de las membranas nanofibrosas

Los ensayos para determinar la actividad bactericida de las membranas nanofibrosas fueron realizados en apego a las normas oficiales para productos germicidas y bactericidas (véase estándar NMX-BB-040-SCFI-1999), mismas que son congruentes con las normas internacionales de la farmacopea. Para estos ensayos se utilizaron bacterias *E. coli* y *S. aureus*, que son los especímenes microbiológicos recomendados como gérmenes tipo para modelos experimentales. Los ensayos bactericidas se realizaron por quintuplicados (conjunto experimental, $n = 5$) para especímenes tomados de las membranas nanofibrosas M91, M82 y M73, mediante la técnica de contacto directo (véase sección 2.5). La Figura 15 muestra la actividad bactericida de estas membranas nanofibrosas contra *E. coli* y *S. aureus*. En este gráfico, la cantidad de bacterias viables es directamente proporcional a la absorbancia medida a una longitud de onda de 595 nm.

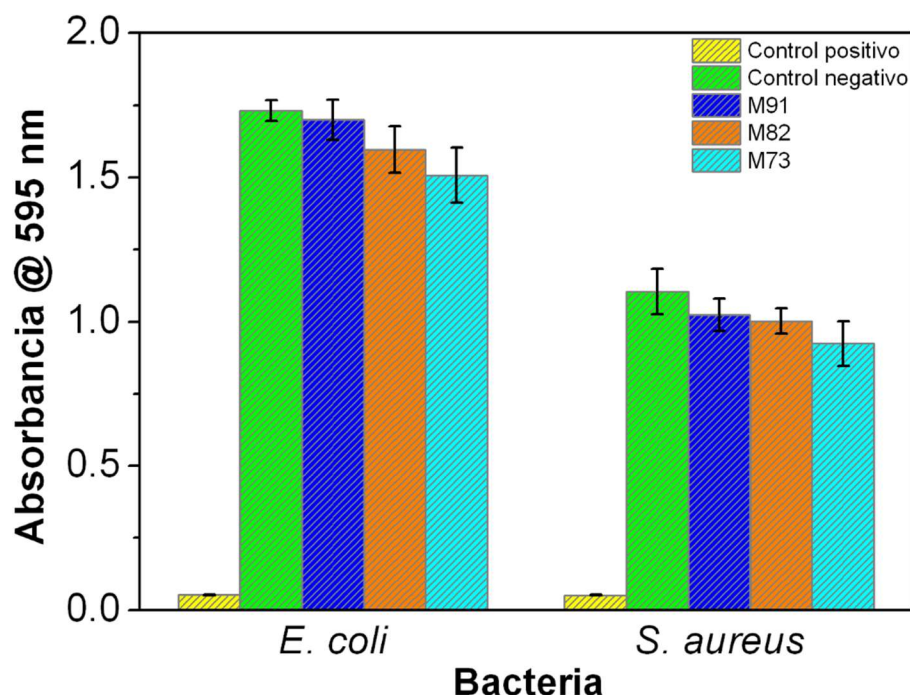


Figura 15. Actividad bactericida obtenida para los especímenes indicados contra las bacterias *E. coli* y *S. aureus*. Los datos se representan como la media $\pm$ desviación estándar para cada conjunto experimental.

Como se observa en la Figura 15, luego de 1 día de incubación, la absorbancia obtenida del caldo de cultivo estéril (control positivo) y el cultivo de *E. coli* (control negativo) fue de 0.052 ± 0.001 y 1.732 ± 0.035 , respectivamente. Estas absorbancias indican una cantidad nula de bacterias viables en el caldo de cultivo estéril, mientras que en el cultivo de *E. coli* representa un número de bacterias viables mayor a cero. Estos valores son congruentes con lo esperado para controles positivo y negativo útiles para determinar, mediante comparación, la actividad bactericida de las membranas ensayadas. Por su parte, la absorbancia medida para los cultivos de *E. coli* que estuvieron en contacto con M91, M82 y M73 fue de 1.699 ± 0.069 , 1.597 ± 0.080 y 1.507 ± 0.095 , respectivamente. Estos valores de absorbancia son menores a los obtenidos para el control negativo.

Para el caso de los ensayos contra *S. aureus* se obtuvo una absorbancia de 0.052 ± 0.001 para el caldo de cultivo estéril (control positivo) y de 1.104 ± 0.078 para el cultivo de *S. aureus* (control negativo) (véase Figura 15).

Asimismo, la absorbancia medida para los cultivos de *S. aureus* que estuvieron en contacto con M91, M82 y M73 fue de 1.023 ± 0.057 , 1.001 ± 0.044 y 0.924 ± 0.078 , respectivamente. Estos resultados son congruentes con los obtenidos de los ensayos contra *E. coli*, ya que las absorbancias medidas son menores a la obtenida para el control negativo. Esto indica que la cantidad de bacterias *E. coli* y *S. aureus* viables disminuye luego de estar en contacto con las membranas ensayadas. Esta disminución es más evidente a medida que el contenido de AgNPs en las membranas nanofibrosas aumenta (véase Tabla I). De hecho, de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis, hay una diferencia estadística significativa ($p < 0.050$) entre la cantidad de bacterias viables en el control negativo y la que se obtuvo de los cultivos *E. coli* ($p = 0.035$) y *S. aureus* ($p = 0.008$) que estuvieron en contacto con M73.

No obstante, la absorbancia obtenida del control positivo es estadísticamente distinta ($p < 0.050$) a la obtenida del ensayo de M91 y M82 contra *E. coli*, $p = 0.001$ y $p = 0.042$, respectivamente; y contra *S. aureus*, $p = 0.011$ y $p = 0.016$, respectivamente. Así, la evidencia experimental obtenida de estos ensayos indica que, en general, las membranas nanofibrosas no se comportan como un agente bactericida tradicional. Más bien, evitan la proliferación de especies Grampositiva y Gramnegativa en su superficie. Esto puede ser una ventaja terapéutica para el tratamiento de lesiones tisulares, ya que podría reducir el uso de antibióticos durante el proceso de regeneración de tejido.

Ahora bien, las membranas CMC-AgNPs/PVA podrían estar lidiando con la proliferación de bacterias a través de la liberación de iones plata desde las AgNPs [57]. De acuerdo con resultados previamente reportados por otros grupos de investigación, estos iones pueden provocar que la membrana celular que rodea el citoplasma de bacterias como *E. coli* y *S. aureus* se encoja o desprenda de su pared celular, facilitando su ingreso al interior de las células [58]. Una vez dentro, estos iones pueden abrirse camino hacia su centro e

interactuar con sus moléculas de ADN y proteínas. Dicha interacción conduce a la pérdida de su habilidad para replicarse y/o la muerte de la bacteria [58].

3.8. Viabilidad celular en las membranas nanofibrosas

En consideración de la actividad bactericida obtenida para M91, M82 y M73, se procedió a evaluar su viabilidad celular usando como modelo a las células de Schwann, mediante ensayos MTT por triplicado (conjunto experimental, $n = 3$). La Figura 16 muestra la viabilidad celular obtenida para el medio DMEM-completo (control negativo) y medio DMEM-completo con 5×10^4 células viables (control positivo), así como para M91, M82 y M73 luego de incubar las células de Schwann durante 1 y 5 días. Es importante mencionar que la cantidad células viables en estos cultivos es directamente proporcional a la absorbancia medida a una longitud de onda de 595 nm.

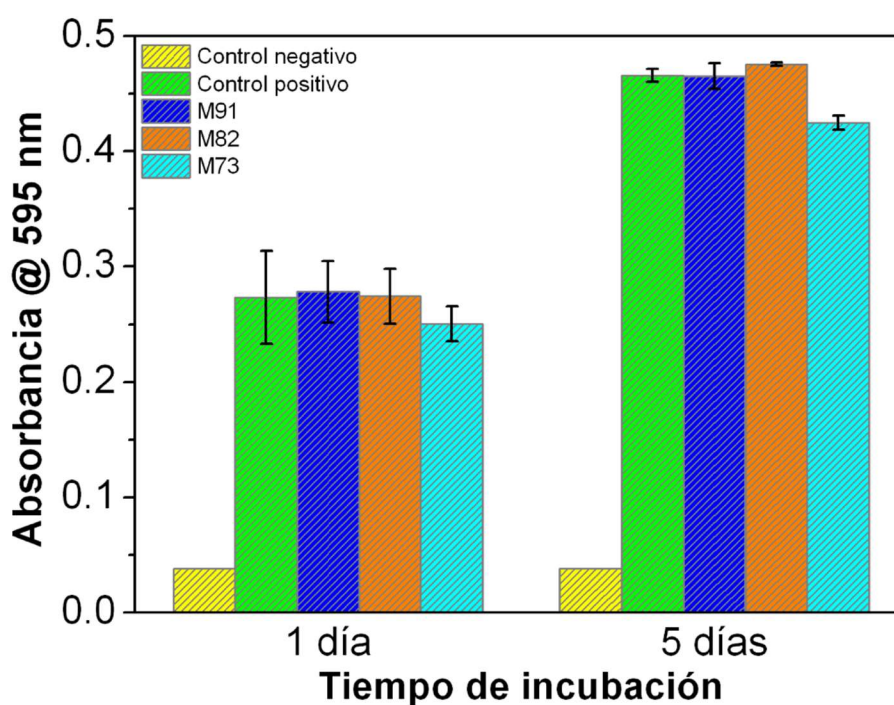


Figura 16. Viabilidad celular obtenida para los especímenes indicados luego de 1 y 5 días de incubación. Los datos se representan como la media $\pm$ desviación estándar para cada conjunto experimental.

Como se observa en la Figura 16, luego de 1 día de incubación, la absorbancia medida de los controles negativo y positivo fue de 0.038 ± 0.001 y 0.273 ± 0.040 , respectivamente. Estas absorbancias se refieren a una cantidad nula de células viables en el control negativo y un número de células viables distinto de cero en el control positivo. Estos valores concuerdan con los esperados de controles útiles para determinar, mediante comparación, la viabilidad celular en los cultivos incubados con las membranas ensayas. Por su parte, la absorbancia de los cultivos incubados en presencia de M91, M82 y M73 fue de 0.278 ± 0.027 , 0.274 ± 0.024 y 0.250 ± 0.015 , respectivamente. De acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis, existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.050$) entre los controles negativo y positivo ($p = 0.031$) luego de 1 día de incubación. Asimismo, no se observa una diferencia significativa entre la cantidad promedio de células viables en el control positivo y en los cultivos incubados durante 1 día en presencia de M91 ($p = 0.863$), M82 ($p = 0.895$) y M73 ($p = 0.781$). Esto sugiere que las membranas nanofibrosas no inducen una toxicidad significativa en el medio biológico utilizado para estos ensayos.

En la Figura 16 también se muestra la viabilidad celular obtenida de manera independiente para estos conjuntos experimentales 5 días de incubación. Como se observa, la absorbancia obtenida del control negativo es análoga a la medida luego de 1 día de incubación (0.038 ± 0.001), mientras que para el control positivo se alcanza una magnitud de 0.466 ± 0.006 , lo que representa una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.002$) entre ambos controles. Esto indica un notable incremento en la cantidad promedio de células viables, respecto a lo obtenido luego de 1 día de incubación. Asimismo, la absorbancia medida de los cultivos incubados en presencia de M91, M82 y M73 fue de 0.465 ± 0.011 , 0.476 ± 0.002 y 0.425 ± 0.006 , respectivamente. De acuerdo con estos resultados, no existe una diferencia estadística significativa entre la cantidad promedio de células viables en el control positivo y los cultivos incubados en presencia de M91 ($p = 0.991$), M82 ($p = 0.859$) y M73 ($p = 0.627$).

Por lo tanto, es seguro decir que las membranas nanofibrosas no inducen una toxicidad significativa al medio biológico y que proveen un ambiente adecuado para la proliferación celular. Como se ha sugerido en la literatura, este comportamiento es congruente con lo esperado para nanomateriales útiles como andamios para ingeniería de tejidos [8, 24, 28].

CAPÍTULO 4.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

En este trabajo de investigación se reportó el desarrollo de membranas nanofibrosas con potenciales aplicaciones en la ingeniería de tejidos, a partir del electrohilado de mezclas poliméricas acuosas de alcohol polivinílico y compósitos basados en nanopartículas de plata inmovilizadas en carboximetil-celulosa. Estas membranas nanofibrosas se obtuvieron a partir de una metodología de tres pasos, la cual involucró: (1) la síntesis verde del compósito CMC-AgNPs, utilizando la CMC como agente reductor y estabilizante; (2) la preparación de mezclas poliméricas acuosas basadas en PVA y el compósito CMC-AgNPs; y (3) preparación de membranas nanofibrosas a partir del electrohilado de mezclas poliméricas acuosas CMC-AgNPs/PVA.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la caracterización del compósito CMC-AgNPs por microscopia electrónica de transmisión, la estructura cristalina de las nanopartículas sintetizadas es congruente con la esperada para la plata. El centro de su distribución de tamaño de partícula se encuentra en 10.4 nm, con una desviación estándar de ± 2.2 nm. Además, los espectros de infrarrojo medidos para este compósito muestran que la estructura molecular de la CMC no cambia de manera visible luego de la síntesis de las AgNPs. No obstante, es posible identificar cambios en la posición de las bandas relacionadas con la vibración de enlaces en los grupos carboximetilo del polímero. Esto sugiere que existe una interacción al menos física entre sus moléculas y la superficie de AgNPs. La evidencia experimental recabada por espectroscopia foto-electrónica de rayos X indica que las AgNPs sintetizadas están inmovilizadas en la CMC a través de enlaces de coordinación con sus grupos carboximetilo.

Como lo ilustran las imágenes obtenidas mediante microscopia electrónica de barrido para las membranas nanofibrosas preparadas, las nanofibras electrohiladas se encuentran libres de defectos. Además, se observó que el centro de la distribución de diámetro de fibra se mueve hacia valores menores a medida que aumenta el contenido en peso del compuesto CMC-AgNPs en la mezcla electrohilada. De acuerdo con la caracterización espectroscópica de estas membranas, este fenómeno se debe a las interacciones tipo puente acetal y/o hidrógeno entre los grupos carboximetilo, acetilo e hidroxilo en la CMC y PVA. Los resultados obtenidos de los ensayos mecánicos de tensión muestran que tanto la disminución en el diámetro de fibra, como las interacciones entre las moléculas de ambos polímeros provocan un incremento en la rigidez de las membranas nanofibrosas. Este incremento en la rigidez está relacionado con el aumento del contenido en peso de CMC-AgNPs en las membranas nanofibrosas. Las propiedades mecánicas de estas membranas son comparables con las deseadas para andamios útiles en ingeniería de tejidos.

Los ensayos bactericidas realizados contra *E. coli* y *S. aureus* indicaron que existen una disminución en la cantidad de bacterias viables en los cultivos que estuvieron en contacto con las membranas nanofibrosas preparadas. Esta disminución está relacionada con el incremento del contenido en peso de AgNPs en dichas membranas. No obstante, la evidencia experimental obtenida de estos ensayos indicó que las membranas nanofibrosas no se comportan como un agente bactericida tradicional. Más bien, evitan la proliferación de especies Grampositiva y Gramnegativa en su superficie. Esto puede ser una ventaja terapéutica para el tratamiento de lesiones tisulares, ya que podría reducir el uso de antibióticos durante el proceso de regeneración de tejido.

Finalmente, los ensayos de viabilidad celular mostraron que luego de 1 día de incubación, el promedio de células de Schwann viables en los cultivos que

estuvieron en contacto con membranas nanofibrosas es semejante al obtenido para cultivos incubados sin membranas. Luego de 5 días de incubación, estos cultivos mostraron un incremento en el promedio de células viables, respecto al obtenido luego de 1 día. Este incremento fue comparable con el medido para cultivos incubados en ausencia de membranas. Esto indica que las membranas nanofibrosas no inducen una toxicidad significativa en el medio biológico y que proveen un ambiente adecuado para la proliferación celular. Este comportamiento es congruente con lo esperado para nanomateriales útiles como andamios para ingeniería de tejidos.

Así, con sustento en la evidencia experimental recabada en este proyecto de tesis, se concluye que el electrohilado de mezclas poliméricas acuosas de alcohol polivinílico y compósitos basados en nanopartículas de plata inmovilizadas en carboximetil-celulosa, permite la obtención de membranas nanofibrosas cuya morfología, actividad bactericida y biocompatibilidad les confieren una potencial aplicación en la ingeniería de tejidos.

4.2. Recomendaciones

En consideración de los hallazgos experimentales obtenidos en este proyecto de investigación, que indican la potencial aplicación de las membranas nanofibrosas en ingeniería de tejidos, se recomienda realizar un estudio sistemático que involucre el uso de CMC con diferentes de grados de sustitución, así como la medición de la hidrofiliidad, hinchabilidad, degradación, actividad bactericida y viabilidad celular de las membranas nanofibrosas. Asimismo, se recomienda incluir agentes de entrecruzamiento a fin de modular estos parámetros, así como para modificar las características morfológicas y propiedades mecánicas de las membranas. Finalmente, se recomienda evaluar la utilidad de estas membranas nanofibrosas a través de modelos *in vivo*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. M. Rahmati, D.K. Mills, A.M. Urbanska, M.R. Saeb, J.R. Venugopal, S. Ramakrishna, M. Mozafari, Electrospinning for tissue engineering applications, *Prog. Mater. Sci.* 117 (2021) 100721. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2020.100721>.
2. K. Dzobo, N.E. Thomford, D.A. Senthebane, H. Shipanga, A. Rowe, C. Dandara, M. Pillay, K.S.C.M. Motaung, Advances in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: Innovation and Transformation of Medicine, *Stem Cells Int.* 2018 (2018) 1–24. <https://doi.org/10.1155/2018/2495848>.
3. M. Rahmati, E.A. Silva, J.E. Reseland, C. A. Heyward, H.J. Haugen, Biological responses to physicochemical properties of biomaterial surface, *Chem. Soc. Rev.* 49 (2020) 5178–5224. <https://doi.org/10.1039/d0cs00103a>.
4. M. Rahmati, C. P. Pennisi, A. Mobasheri and M. Mozafari, *Cell Biology and Translational Medicine*, Springer, 2018, vol. 3, pp. 73–89.
5. S. Pina, J.M. Oliveira, R.L. Reis, Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: A review, *Adv. Mater.* 27 (2015) 1143–1169. <https://doi.org/10.1002/adma.201403354>.
6. M.G. Ali, H.M. Mousa, F. Blaudez, M.S. Abd El-sadek, M.A. Mohamed, G.T. Abdel-Jaber, A. Abdal-hay, S. Ivanovski, Dual nanofiber scaffolds composed of polyurethane- gelatin/nylon 6- gelatin for bone tissue engineering, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 597 (2020) 124817. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124817>.
7. S. Mombini, J. Mohammadnejad, B. Bakhshandeh, A. Narmani, J. Nourmohammadi, S. Vahdat, S. Zirak, Chitosan-PVA-CNT nanofibers as electrically conductive scaffolds for cardiovascular tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.* 140 (2019) 278–287. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.046>.

8. J. Wang, L. Tian, B. Luo, S. Ramakrishna, D. Kai, X.J. Loh, I.H. Yang, G.R. Deen, X. Mo, Engineering PCL/lignin nanofibers as an antioxidant scaffold for the growth of neuron and Schwann cell, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 169 (2018) 356–365. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.05.021>.
9. A. Ghaee, S. Bagheri-Khoulenjani, H. Amir Afshar, H. Bogheiri, Biomimetic nanocomposite scaffolds based on surface modified PCL-nanofibers containing curcumin embedded in chitosan/gelatin for skin regeneration, *Compos. Part B Eng.* 177 (2019) 107339. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2019.107339>.
10. G.L. Koons, M. Diba, A.G. Mikos, Materials design for bone-tissue engineering, *Nat. Rev. Mater.* 5 (2020) 584–603. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0204-2>.
11. Y. Liu, D. Luo, T. Wang, Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue Engineering, *Small*. 12 (2016) 4611–4632. <https://doi.org/10.1002/smll.201600626>.
12. P. Sensharma, G. Madhumathi, R.D. Jayant, A.K. Jaiswal, Biomaterials and cells for neural tissue engineering: Current choices, *Mater. Sci. Eng. C*. 77 (2017) 1302–1315. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.264>.
13. A.C. Mendes, E.T. Baran, R.L. Reis, H.S. Azevedo, Self-assembly in nature: Using the principles of nature to create complex nanobiomaterials, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*. 5 (2013) 582–612. <https://doi.org/10.1002/wnan.1238>.
14. R. Vasita, D.S. Katti, Nanofibers and their applications in tissue engineering, *Int. J. Nanomedicine*. 1 (2006) 15–30. <https://doi.org/10.2147/nano.2006.1.1.15>.
15. H.S. Liao, J. Lin, Y. Liu, P. Huang, A. Jin, X. Chen, Self-assembly mechanisms of nanofibers from peptide amphiphiles in solution and on substrate surfaces, *Nanoscale*. 8 (2016) 14814–14820. <https://doi.org/10.1039/c6nr04672j>.

16. S. Ling, C. Li, J. Adamcik, S. Wang, Z. Shao, X. Chen, R. Mezzenga, Directed growth of silk nanofibrils on graphene and their hybrid nanocomposites, *ACS Macro Lett.* 3 (2014) 146–152. <https://doi.org/10.1021/mz400639y>.
17. Y. Yu, S. Hua, M. Yang, Z. Fu, S. Teng, K. Niu, Q. Zhao, C. Yi, Fabrication and characterization of electrospinning/3D printing bone tissue engineering scaffold, *RSC Adv.* 6 (2016) 110557–110565. <https://doi.org/10.1039/C6RA17718B>.
18. R.C. Nonato, L.H.I. Mei, B.C. Bonse, E.F. Chinaglia, A.R. Morales, Nanocomposites of PLA containing ZnO nanofibers made by solvent cast 3D printing: Production and characterization, *Eur. Polym. J.* 114 (2019) 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.02.026>.
19. J. Dong, C. Mei, J. Han, S. Lee, Q. Wu, 3D printed poly(lactic acid) composites with grafted cellulose nanofibers: Effect of nanofiber and post-fabrication annealing treatment on composite flexural properties, *Addit. Manuf.* 28 (2019) 621–628. <https://doi.org/10.1016/j.addma.2019.06.004>.
20. J. Dong, M. Li, L. Zhou, S. Lee, C. Mei, X. Xu, Q. Wu, The influence of grafted cellulose nanofibers and postextrusion annealing treatment on selected properties of poly(lactic acid) filaments for 3D printing, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 55 (2017) 847–855. <https://doi.org/10.1002/polb.24333>.
21. M.A. Elnaggar, H.A.N. El-Fawal, N.K. Allam, Biocompatible PCL-nanofibers scaffold with immobilized fibronectin and laminin for neuronal tissue regeneration, *Mater. Sci. Eng. C.* 119 (2021) 111550. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111550>.
22. T. Yao, H. Chen, P. Samal, S. Giselbrecht, M.B. Baker, L. Moroni, Self-assembly of electrospun nanofibers into gradient honeycomb structures, *Mater. Des.* 168 (2019) 107614. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2019.107614>.

23. A. Keirouz, M. Chung, J. Kwon, G. Fortunato, N. Radacsi, 2D and 3D electrospinning technologies for the fabrication of nanofibrous scaffolds for skin tissue engineering: A review, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*. 12 (2020) 1–32. <https://doi.org/10.1002/wnan.1626>.
24. P. Basu, A. Repanas, A. Chatterjee, B. Glasmacher, U. Narendrakumar, I. Manjubala, PEO–CMC blend nanofibers fabrication by electrospinning for soft tissue engineering applications, *Mater. Lett.* 195 (2017) 10–13. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.02.065>.
25. S.A. Salim, S.A. Loutfy, E.M. El-Fakharany, T.H. Taha, Y. Hussien, E.A. Kamoun, Influence of chitosan and hydroxyapatite incorporation on properties of electrospun PVA/HA nanofibrous mats for bone tissue regeneration: Nanofibers optimization and in-vitro assessment, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 62 (2021) 102417. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102417>.
26. M. A. Martínez-Rodríguez, Desarrollo de materiales nanofibrosos basados en compósitos de nanopartículas de plata y polisacáridos, Tesis de Licenciatura, UANL-FIME (2017).
27. M.A. Elnaggar, H.A.N. El-Fawal, N.K. Allam, Biocompatible PCL-nanofibers scaffold with immobilized fibronectin and laminin for neuronal tissue regeneration, *Mater. Sci. Eng. C*. 119 (2021) 111550. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111550>.
28. Z. Moazzami Goudarzi, T. Behzad, L. Ghasemi-Mobarakeh, M. Kharaziha, An investigation into influence of acetylated cellulose nanofibers on properties of PCL/Gelatin electrospun nanofibrous scaffold for soft tissue engineering, *Polymer* 213 (2021) 123313. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.123313>.
29. I.C. Carvalho, H.S. Mansur, A.G. Leonel, A.A.P. Mansur, Z.I.P. Lobato, Soft matter polysaccharide-based hydrogels as versatile bioengineered platforms for brain tissue repair and regeneration, *Int. J. Biol. Macromol.* 182 (2021) 1091–1111. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.116>.

30. T. Chakraborty, I. Chakraborty, S. Ghosh, Sodium Carboxymethylcellulose–CTAB Interaction: A Detailed Thermodynamic Study of Polymer–Surfactant Interaction with Opposite Charges, *Langmuir* 22 (2006) 9905–9913. <https://doi.org/10.1021/la0621214>.
31. C. Alvarez-Lorenzo, B. Blanco-Fernandez, A.M. Puga, A. Concheiro, Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 1148–1171. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.04.016>.
32. M. N. Nadagouda, R. S. Varma, Synthesis of thermally stable carboxymethyl cellulose/metal biodegradable nanocomposites for potential biological applications, *Biomacromolecules*. 8 (2007) 2762–2767. <https://doi.org/10.1021/BM700446P>.
33. K.M. Rao, B. Mallikarjuna, K.S.V.K. Rao, M.N. Prabhakar, K.C. Rao, M.C.S. Subha, Preparation and characterization of pH sensitive poly(vinyl alcohol)/sodium carboxymethyl cellulose IPN microspheres for in vitro release studies of an anti-cancer drug, *Polym. Bull.* 68 (2012) 1905–1919. <https://doi.org/10.1007/s00289-011-0675-9>.
34. S. Yang, S. Fu, Y. Zhou, C. Xie, X. Li, Preparation and release properties of a pH-tunable carboxymethyl cellulose hydrogel/methylene blue host/guest model, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 60 (2011) 62–74. <https://doi.org/10.1080/00914037.2010.504160>.
35. A. Bédier, M. Genta, N. Kunz, C. Verheyen, M. Martins, J. Brefie-Guth, T. Braschler, Design of an elastic porous injectable biomaterial for tissue regeneration and volume retention, *Acta Biomater.* 142 (2022) 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.01.050>.
36. S.S. Bhutada, M. Sriram, D.S. Katti, Sulfated carboxymethylcellulose conjugated electrospun fibers as a growth factor presenting system for tissue engineering, *Carbohydr. Polym.* 268 (2021) 118256. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118256>.
37. M.A. Martínez-Rodríguez, M.A. Garza-Navarro, I.E. Moreno-Cortez, R. Lucio-Porto, V.A. González-González, Silver/polysaccharide-based

- nanofibrous materials synthesized from green chemistry approach, *Carbohydr. Polym.* 136 (2016) 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.014>.
38. I.X. Yin, J. Zhang, I.S. Zhao, M.L. Mei, Q. Li, C.H. Chu, The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry, *Int. J. Nanomedicine.* 15 (2020) 2555–2562. <https://doi.org/10.2147/IJN.S246764>.
39. H.D. Beyene, A.A. Werkneh, H.K. Bezabh, T.G. Ambaye, Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review, *Sustain. Mater. Technol.* 13 (2017) 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2017.08.001>.
40. S.H. Lee, B.H. Jun, Silver nanoparticles: Synthesis and application for nanomedicine, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 865. <https://doi.org/10.3390/ijms20040865>.
41. A.A. Mitiku, B. Yilma, A Review on Green Synthesis and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 46 (2017) 52–57.
42. M. A. Martínez-Rodríguez, E. Madla-Cruz, V. H. Urrutia-Baca, M.A. de la Garza-Ramos, V. A. González-González, M. A. Garza-Navarro, Influence of Polysaccharides' Molecular Structure on the Antibacterial Activity and Cytotoxicity of Green Synthesized Composites Based on Silver Nanoparticles and Carboxymethyl-Cellulose, *Nanomaterials.* 10 (2020) 1164. <https://doi.org/10.3390/nano10061164>.
43. E.I. Weiss, M. Shalhav, Z. Fuss, Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test, *Endod. Dent. Traumatol.* 12 (1996) 179–184. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1996.tb00511.x>.
44. J. Wu, F. Zhang, H. Zhang, Facile synthesis of carboxymethyl curdlan-capped silver nanoparticles and their application in SERS, *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.033>.

45. J. Liu, F. He, T.M. Gunn, D. Zhao, C.B. Roberts, Precise Seed-Mediated Growth and Size-Controlled Synthesis of Palladium Nanoparticles Using a Green Chemistry Approach, *Langmuir*. 25 (2009) 7116–7128. <https://doi.org/10.1021/la900228d>
46. S. Reiche, R. Blume, X.C. Zhao, D. Su, E. Kunkes, M. Behrens, R. Schlögl, Reactivity of mesoporous carbon against water – An in-situ XPS study, *Carbon* N. Y. 77 (2014) 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2014.05.019>
47. A. V. Naumkin, A. Kraut-Vass, S.W. Gaarenstroom, C.J. Powell, NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) Database, Version 4.1 (Web Version). <https://doi.org/10.18434/T4T88K>
48. A.A.P. Mansur, F.G. de Carvalho, R.L. Mansur, S.M. Carvalho, L.C. de Oliveira, H.S. Mansur, Carboxymethylcellulose/ZnCdS fluorescent quantum dot nanoconjugates for cancer cell bioimaging, *Int. J. Biol. Macromol.* 96 (2017) 675–686. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.12.078>
49. Q. Xu, X. Ke, L. Shen, N. Ge, Y. Zhang, F. Fu, X. Liu, Surface modification by carboxymethyl chitosan via pad-dry-cure method for binding Ag NPs onto cotton fabric, *Int. J. Biol. Macromol.* 111 (2018) 796–803. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.01.091>
50. Q. Xu, L. Xie, H. Diao, F. Li, Y. Zhang, F. Fu, X. Liu, Antibacterial cotton fabric with enhanced durability prepared using silver nanoparticles and carboxymethyl chitosan, *Carbohydr. Polym.* 177 (2017) 187–193. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.08.129>
51. B.H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, 2005. <https://doi.org/10.1002/0470011149>.
52. N. Charernsriwilaiwat, P. Opanasopit, T. Rojanarata, T. Ngawhirunpat, P. Supaphol, Preparation and characterization of chitosan-hydroxybenzotriazole/polyvinyl alcohol blend nanofibers by the electrospinning technique, *Carbohydr. Polym.* 81 (2010) 675–680. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.03.031>.

53. Y. Lin, L. Wang, J. Zhou, L. Ye, H. Hu, Z. Luo, L. Zhou, Surface modification of PVA hydrogel membranes with carboxybetaine methacrylate via PET-RAFT for anti-fouling, *Polymer* 162 (2019) 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2018.12.026>
54. O.A. Laput, D.A. Zuza, I. V. Vassenina, I.A. Kurzina, Chemical state and morphology of Zn and Mg ion-implanted polyvinyl alcohol, *Surf. Coatings Technol.* 389 (2020) 125558. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2020.125558>
55. M. ElMessiry, N. Fadel, The tensile properties of electrospun Poly Vinyl Chloride and Cellulose Acetate (PVC/CA) bi-component polymers nanofibers, *Alexandria Eng. J.* 58 (2019) 885–890. <https://doi.org/10.1016/j.aej.2019.08.003>.
56. C.E. Dumont, W. Born, Stimulation of neurite outgrowth in a human nerve scaffold designed for peripheral nerve reconstruction, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 73 (2005) 194–202. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30202>.
57. S. Kittler, C. Greulich, J. Diendorf, M. Köller, M. Eppe, Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions, *Chem. Mater.* 22 (2010) 4548–4554. <https://doi.org/10.1021/cm100023p>.
58. Q. L. Feng, J. Wu, G.Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, J. O. Kim, A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *J. Biomed. Mater. Res.* 52 (2000) 662–668. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20001215\)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3).