



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTO DE NANOTUBOS DE CARBONO FUNCIONALIZADOS COMO
MODULADORES DE LA CRISTALIZACIÓN *IN VITRO* DE OXALATO
CÁLCICO MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELECTROCRISTALIZACIÓN.**

ANDRÉS MARCELO VARGAS FERNÁNDEZ

Tesis para optar a Título
Profesional de Médico
Veterinario y Grado de Magister
en Cs Animales y Veterinarias.
Depto. de Cs. Biológicas
Animales.

PROFESOR GUÍA: DR ANDRÓNICO NEIRA-CARRILLO

UNIVERSIDAD DE CHILE

PROYECTO FONDECYT REGULAR N°1140660

SANTIAGO, CHILE

2016



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTO DE NANOTUBOS DE CARBONO FUNCIONALIZADOS COMO
MODULADORES DE LA CRISTALIZACIÓN *IN VITRO* DE OXALATO
CÁLCICO MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELECTROCRISTALIZACIÓN.**

ANDRÉS MARCELO VARGAS FERNÁNDEZ

Tesis para optar a Título
Profesional de Médico
Veterinario y Grado de Magister
en Cs Animales y Veterinarias.
Depto. de Cs. Biológicas
Animales.

Nota Final.....

Prof. Guía	ANDRÓNICO NEIRA-CARRILLO	Firma.....
Profesor Corrector	JOSÉ LUIS ARIAS	Firma.....
Profesor Corrector	MEHRDAD YAZDANI-PEDRAM	Firma.....

PROFESOR GUÍA: DR. ANDRÓNICO NEIRA-CARRILLO

FONDECYT N° 1140660

SANTIAGO, CHILE

2016

DEDICATORIA

Es difícil plasmar en palabras, lo mucho que he crecido como investigador bajo la supervisión del grupo del Dr. Neira-Carrillo. Dr. Andrónico para sus estudiantes, colaboradores y amigos. Estando en su grupo conocí personas extraordinarias, de gran calidad tanto profesional como humana, Yazmín, que ahora se encuentra realizando un magíster en el extranjero, Marianela que está terminando su tesis Doctoral, Eduardo y Patricio, ambos amigos y fundadores de un proyecto que comenzamos juntos gracias a que pude formar parte de este grupo de investigación. El primero compañero de generación que se tituló en este grupo bajo la supervisión de Marianela, muy buen compañero y amigo. Patricio, quien fue mi supervisor dentro del trabajo de mi tesis de magíster, siendo su fuerza y tenacidad lo que dio una gran parte de la fuerza de lo que fue el proyecto CEIAP en sus orígenes, manteniéndose vigente hasta hoy en 2016, no tengo palabras para transmitir la gratitud que siento por todo el trabajo y la entrega desarrollada en cada uno de los desafíos que se nos plantearon como grupo de investigación como también de proyecto.

Agradecimientos especiales a (al Dr.) Andrónico Neira-Carrillo, por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, dándome la oportunidad de realizar esta tesis de magíster y desenvolverme como investigador, a pesar de nuestras diferencias más que un profesor, fue un guía y un amigo en mi formación académica como personal.

Agradecimientos a mi familia y mis amigos, a los que están y a los que fueron, porque sin ellos hubiese sido mucho más difícil llegar a esta instancia, agradecimientos a las que fueron mis compañeras de ruta, a mis profesores y correctores, a mis compañeros de laboratorio, a todos.

Y bueno finalizando esta dedicatoria, nada más que agregar una reflexión, que en el desarrollo de nuestro quehacer, nunca debemos olvidarnos que mientras más avanzamos, podemos ver lo pequeños que fuimos y lo mucho que hemos crecido...

Andrés V.

ABREVIATURAS

AE:	Electrodo auxiliar.
Ag/AgCl:	Plata/Cloruro de plata.
Al ₂ SiO ₅ :	Aluminosilicato.
C ₂ H ₃ NaO ₂ :	Acetato de sodio.
Ca(NO ₃) ₂ :	Nitrato de calcio.
CaCl ₂ :	Cloruro de calcio.
CaCO ₃ :	Carbonato de calcio.
CaOx:	Oxalato de calcio.
cc:	Corriente constante.
CNTs:	Nanotubos de carbono.
COD:	Oxalato de calcio dihidratado.
COM:	Oxalato de calcio monohidratado.
-COO ⁻ :	Grupos carboxilatos.
COT:	Oxalato de calcio trihidratado.
EC:	Electrocristalización.
EPD	Deposición Electroforética
EDTA:	Ácido etilendiaminotetracético.
FTIR/ATR:	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier.
H ₂ SO ₄ :	Ácido sulfúrico.
HCl:	Ácido clorhídrico.
HKS:	Cálculos renales humanos.
HNO ₃ :	Ácido nítrico.
IA:	Ácido itacónico.
IAP:	Producto de actividad iónica.
ITO:	Óxido de indio estaño.
MMI:	Monometilitaonato.
MODI:	Monooctadecilitaonato.
MO	Microscopía Óptica
MWCNT:	Nanotubos de carbono multipared.
MWCNT-Ox:	Nanotubos de carbono multipared oxidados.
MWCNT-Ox-IA:	Nanotubos de carbono multipared oxidados y funcionalizados con ácido itacónico.
MWCNT-Ox-MMI:	Nanotubos de carbono multipared oxidados y funcionalizados con monometilitaonato.
MWCNT-Ox-MODI:	Nanotubos de carbono multipared oxidados y funcionalizados con monooctadecilitaonato.
Na ₂ C ₂ O ₄ :	Oxalato de sodio.
NaOH:	Hidróxido de sodio.
O ₂ :	Oxígeno molecular.
OPN:	<u>Osteopontina.</u>

Ox ²⁻ :	Iones oxalato.
PAA:	Ácido poliacrílico.
PHO:	Hiperoxaluria primaria.
RE	Electrodo de Referencia
SEM:	Microscopía electrónica de barrido.
SEM-EDS:	Microscopía electrónica de barrido acoplada con microanálisis de rayos x.
SHO:	Hiperoxaluria secundaria.
SWCNT:	Nanotubo de carbono de pared simple.
THP:	Proteína Tamm-Horsfall.
WE:	Electrodo de trabajo.
XRD:	Difracción de rayos X.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

RESUMEN	7
SUMMARY	8
INTRODUCCIÓN	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	12
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
1. Obtener y caracterizar MWCNT funcionalizados con grupos funcionales ácidos y ésteres	20
2. Evaluar el efecto de MWCNT funcionalizados como aditivos en ensayos de electro-cristalización de CaOx in vitro	22
3. Determinar la morfología, microanálisis elemental y polimorfismo de los cristales CaOx obtenidos mediante microscopía óptica (MO) y electrónica de barrido (SEM), dispersión por energía dispersiva de rayos X (EDX) y difracción de rayos X (XRD) ..	26
RESULTADO	28
1. Obtención y caracterización de MWCNT funcionalizados con grupos funcionales ácidos y ésteres	28
2. Evaluación el efecto de MWCNT funcionalizados como aditivos en ensayos de electro-cristalización de CaOx in vitro	30
3. Determinación la morfología, microanálisis elemental y polimorfismo de los cristales caox obtenidos mediante microscopía óptica (MO) y electrónica de barrido (SEM), dispersión por energía dispersiva de rayos X (EDX) y difracción de rayos X (XRD)	30
3.1 Microscopía optica (mo) y electronica de barrido (sem) sin aditivo	40
3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM) en presencia de citrato, MWCNT-IA, MWCNT-MMI y MWCNT-MODI	51
3.3 Microscopía electronica de barrido acoplado a energía dispersiva (SEM-EDS) sin presencia de aditivo	56
3.4 Difracción de rayos X (XRD)	62
DISCUSIÓN	68
CONCLUSIÓN	73
BIBLIOGRAFÍA	75
ANEXO	88

RESUMEN

La biomineralización patológica de oxalato de calcio (CaOx) dentro del tracto urinario produce una enfermedad denominada urolitiasis. El CaOx presenta tres variedades en la naturaleza: CaOx monohidratado (COM), CaOx dihidratado (COD) y CaOx trihidratado (COT). Dentro de estos últimos COD y COM representan los polimorfos mayoritarios en los cálculos urinarios en mamíferos. Distintas formas de obtener cristales se han descrito a lo largo de los años, sin embargo, recientemente la electrocristalización se ha descrito como una técnica que permite obtener de manera fácil y rápida cristales de CaOx.

En esta Tesis de Magíster se realizaron ensayos de electrocristalización de CaOx modificando variables experimentales tales como: apertura/cierre de celda electroquímica, temperatura y corriente eléctricas. Finalmente en presencia de aditivos, como es citrato y nanotubos de carbono multipared funcionalizados con diferentes compuestos acídicos: ácido itacónico (AI), monometilitaconato (MMI) y mono-octadecil-itacontato (MODI) fueron evaluados como moldes en los ensayos de electrocristalización de CaOx.

Los resultados experimentales mostraron que fue posible controlar selectivamente la morfología de cristales CaOx al variar las variables antes mencionadas obteniendo cristales COM y COD en los ensayos de electrocristalización *in vitro*. Las variables temperatura y cierre de la celda electroquímica afectaron la nucleación, crecimiento y agregación de cristales CaOx. La superficie de los WE fue cubierta por cristales CaOx de gran tamaño ($>100 \mu\text{m}$) en celdas electroquímicas (ECCs) sometidas a 60°C . Por otra parte, se obtuvieron cristales CaOx de menor tamaño ($3 \mu\text{m}$ a $20 \mu\text{m}$) en ECCs sometidas a temperaturas de 23°C . La difracción de rayos-X (XRD) fue utilizada para evaluar la estructura cristalográfica de los cristales CaOx formados en los diferentes ensayos de electrocristalización. La técnica de XRD de CaOx mostró difractogramas correspondiente a COM con predominancia del plano cristalográfico (222), las cuales fueron identificadas por la aparición de picos de difracción entre $25,8$ - $26,2^\circ$, e intensidad mayor a 70.000 (u.a). En resumen, MWCNT funcionalizados con grupos acídicos resultaron ser inhibidores más eficientes que el citrato y un orden de inhibición como sigue: $\text{MODI} < \text{MMI} < \text{IA}$.

De esta forma, nuestros resultados sugieren que la técnica de electrocristalización constituiría un método de cristalización efectivo y novedoso para evaluar nuevos aditivos y/o moldes moduladores de la morfología, estructura y polimorfismo de CaOx

SUMMARY

The pathological biomineralization of calcium oxalate (CaOx) within the urinary tract causes a disease called urolithiasis. CaOx has three varieties in Nature: CaOx monohydrate (COM), CaOx dihydrate (COD) and CaOx trihydrate (COT). Among the latter COD and COM represent the majority polymorphs in urinary calculi in mammals. Different ways to obtain crystals have been described over the years; however, recently electrocrystallization has been described as a technique to obtain easily and quickly CaOx crystals.

This Master thesis conducted trials of electrocrystallization CaOx modifying experimental variables such as opening/closing electrochemical cell, temperature (T°) and current (V). Finally in the presence of additives, as is citrate and carbon nanotubes multiwall functionalized (MWCNT-FN) with various acidic compounds: itaconic acid (IA), monometilitaconato (MMI) and monooctadecyl itaconato (MODI) were evaluated as templates in CaOx electrocrystallization assays.

The experimental results showed that it was possible to selectively control the morphology of CaOx crystals by varying the variables above mentioned inducing COD COM crystals in the *in vitro* electrocrystallization assays. The variables temperatura (T°) and closing of the electrochemical cell affected nucleation, crystal growth and aggregation of CaOx. The WE surface was covered by the presence of large CaOx crystals ($> 100 \mu\text{m}$) in electrochemical cells (ECCs) under 60°C . On the other hand, smaller CaOx crystals ($3 \mu\text{m}$ to $20 \mu\text{m}$) was obtained in CCTs under lowerer temperatures (23°C). The X-ray diffraction (XRD) analysis showed a typical COM diffractogram with predominance of crystallographic faces (222), which were identified by the appearance of diffraction peaks between $25,8$ - $26,2^{\circ}$, and the greater intensity $70,000$ (u.a). In summary, functionalized MWCNT with acidic groups they were found to be more efficient than citrate and all of them showed the follow inhibition order: $\text{MODI} < \text{MMI} < \text{IA}$.

Thus, our results suggest that the electrocrystallization technique should be an effective and novel crystallization method to evaluate new additives and/or modulators templates of the morphology, structure and polymorphism of CaOx.

INTRODUCCIÓN

La biomineralización es el estudio de materiales biológicamente controlados, constituyendo un fenómeno ampliamente extendido en la naturaleza (Mann *et al.* 1996). Los materiales biomineralizados presentan funciones diversas, tales como: protección, defensa, detoxificación, etc. (Dove *et al.* 2003; Yao *et al.* 2010). Estos materiales frecuentemente otorgan mayor rigidez y resistencia a algunos tejidos biomineralizados (Eccles, 2010), los cuales poseen un componente inorgánico mayoritario (95% del peso) y un componente orgánico minoritario (Borissova *et al.* 2010). Además, el proceso de biomineralización puede estar implicado en la manifestación de cuadros patológicos (Eccles, 2010), uno de ellas es la urolitiasis, que corresponde a la formación de cálculos o concreciones en el interior del tracto urinario. Esta patología se presenta tanto en animales de compañía (Osborne *et al.* 2009) y granja (Eccles, 2010), como en seres humanos (Curhan *et al.* 2007).

El oxalato de calcio (CaOx) es uno de los biominerales más abundantes en las plantas (Monje y Baran, 2002), y representa el principal constituyente de los cálculos urinarios en mamíferos, incluido el ser humano (~70%) (Khan y Canales. 2009; Li *et al.* 2009). El CaOx presenta tres formas cristalinas o polimorfos en la naturaleza: oxalato de calcio monohidratado COM ($\text{CaC}_2\text{O}_4(\text{H}_2\text{O})$), dihidratado COD ($\text{CaC}_2\text{O}_4(\text{H}_2\text{O})_2$) y trihidratado COT ($\text{CaC}_2\text{O}_4(\text{H}_2\text{O})_3$). Los dos primeros son las formas más comunes de encontrar en los cálculos urinarios (40-60%) (Moe, 2006). COD presenta un forma de bpirámide de base cuadrada, COM de prisma y COT un paralelepípedo levemente inclinado (Borissova *et al.*, 2010). Además, los polimorfos difieren en tamaño, COD mide $\pm 1,2 \times 2,7 \mu\text{m}$ y COM $\pm 5,0 \times 2,0 \mu\text{m}$ (Zhang *et al.* 2008). Los cristales COM poseen mayor capacidad para agregarse entre sí, y agregarse a células tubulares renales que cristales COD (Sayan *et al.* 2009). Las membranas celulares tubulares renales (MDCK) tiene efectos duales (inhibitorios y promotores) sobre los cristales COM. Aunque el crecimiento individual de cristales COM fue inhibido, su agregación fue promovida, esta inducción de COM ocurre al mismo tiempo que COM es transformado en cristales COD (Chutipongtanate *et al.* 2012).

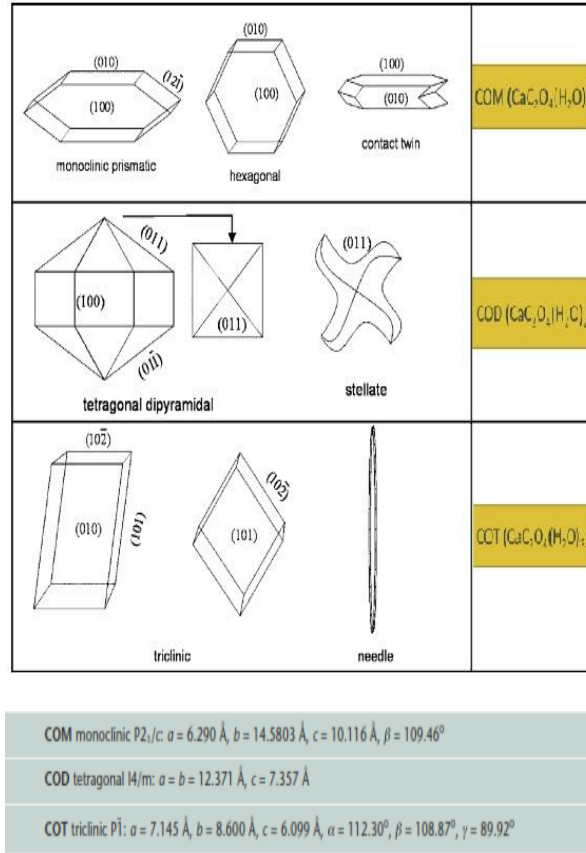


Fig 1. Fases cristalinas de CaOx según su hidratación y angulación (Wesson and Ward, 2007; Yu *et al.*, 2004).

Los inhibidores de la urolitiasis son agentes que retardan las etapas involucradas en la formación de cálculos renales tales como: nucleación, crecimiento y agregación de cristales, adhesión a células epiteliales renales, etc. Numerosos estudios han abordado el tema de los inhibidores naturales presentes en la orina, describiendo la participación tanto de moléculas de bajo peso molecular tales como: pirofosfato (Monneron *et al.* 2000), magnesio (Mg²⁺) y citrato (Kato *et al.* 2004; Sanchis, 2008), entre otros, como de macromoléculas de alto peso molecular: glicosaminoglicanos (condroitín sulfato o heparán sulfato), y proteínas (Osteopontina (OPN) (Xiao *et al.*, 2014), proteína de Tamm-Horsfall (THP) (Raila *et al.* 2014), etc.

En los últimos años, se han desarrollado investigaciones para cuantificar la participación de THP y OPN. Raila y su equipo el 2014 concluyeron a través de un trabajo titulado “An evaluation of Tamm–Horsfall protein glycans in kidney stone formers using

novel techniques” donde se apoya el efecto inhibitor de la agregación cristalina de THP y sugiere que, la expresión reducida y la glicosilación anormal de THP contribuye a la reducción de la función, y por lo tanto es un factor de riesgo y un posible biomarcador para nefrolitiasis. (Raila *et al.* 2014)

Argade y su equipo el año 2015 evaluaron la relación de THP en la excreción renal de perros con enfermedad renal, titulada “Relationship between urinary Tamm–Horsfall protein excretion and renal function in dogs with naturally occurring renal disease”, y con ello sugirieron a THP como un posible biomarcador de daño tubular. (Argade *et al.*2015).

Por otro lado, considerando a THP como biomarcador, Mohamaden y su equipo el 2014 hicieron una cuantificación de RNA mensajero para THP y OPN en tejido renal canino posterior a una inyección de oxalato de potasio a través de un ensayo de inmunohistoquímica, este trabajo cuyo nombre es “Immunohistochemical localization and mRNA quantification of osteopontin and Tamm-Horsfall protein in canine renal tissue after potassium oxalate injection”. La expresión de RNAm de OPN aumenta significativamente en perros tratados cuando disminuye significativamente el RNAm de THP, por lo tanto OPN y THP se encuentran relacionados en la exposición de urolitiasis. (Mohamaden *et al.* 2014)

Otra línea de investigación sugiere que niveles del polimorfismo del gen de OPN en orina y suero, puede ser un posible marcador de urolitiasis, este trabajo fue hecho por Xiao y su equipo el año 2014 y se titula “Roles of Osteopontin Gene Polymorphism (rs1126616), Osteopontin Levels in Urine and Serum, and the Risk of Urolithiasis: A Meta-Analysis”. Según Xiao, este análisis sugiere que los portadores del alelo T existe un riesgo mayor de urolitiasis, además, los niveles inferiores de OPN detectados en orina y suero en pacientes con urolitiasis demostró el papel importante de OPN en este proceso, reforzando lo planteado hasta ahora. En resumen, el polimorfismo del gen y el nivel de OPN podrían indicar un nivel de riesgo de la enfermedad, y con ello con planes de detección temprana, pudiendo así ser útil en la predicción y prevención en poblaciones susceptibles (Xiao *et al.* 2014).

En literatura se describe el uso de aditivos moduladores de la cristalización de CaOx, sin embargo no existen antecedentes usando nanomateriales tales como nanotubos

de carbono (CNT) como moduladores de cristalización de CaOx. El uso de CNT funcionalizados con grupos ácidos ha sido recientemente utilizado como un modificador de la cristalización de carbonato de calcio (CaCO₃) en nuestro laboratorio. (Neira-Carrillo *et al.*, 2014-2015, resultados no publicados).

Según lo anteriormente expuesto en esta Tesis se prepararán CNT funcionalizados con grupos químicos ácidos, estos son ácido itacónico (IA), monometilitacontato (MMI) y monooctadecilitaonato (MODI), los cuales representan entidades químicas con similitud estructural a los inhibidores naturales, estos poseen grupos carboxilos, y se evaluará su efecto en la nucleación y crecimiento de cristales de CaOx usando una técnica de electrocristalización *in vitro*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La biomineralización es el estudio de la estructura, formación y propiedades de sólidos inorgánicos depositados en los sistemas biológicos. Un ejemplo de este fenómeno son los tipos de conchas y microesqueletos, a base de carbonatos, existentes en la naturaleza. Esta disciplina entrega información relevante a otras disciplinas, como la paleontología, también aporta conocimiento al estudio de fenómenos biológicos patológicos, como lo es la urolitiasis (Mann, 2002). La urolitiasis se define como la presencia de uno o más cálculos en cualquier ubicación dentro del tracto urinario. Los cálculos corresponden a cúmulos de diversos componentes *e.i.* fosfatos, ácido úrico, cistina, oxalatos y mezclas (cálculos mixtos compuestos por oxalato-fosfato) (Sanchis, 2008). El CaOx es el componente principal en casos de urolitiasis en seres humanos, acercándose a un 70% de los casos en el mundo (Wesson *et al.* 2007) y posee aproximadamente un 10-12% de prevalencia de la población humana en países industrializados y en vías de desarrollo (Bihl y Meyers, 2001). En animales de compañía su recurrencia es alta (Lulich *et al.* 2000), alcanzando un 18% en perros, la cual ha ido aumentando un 5% desde el año 1981 (Buffington *et al.* 1997). Además, hay diferencias por sexo (género), presentándose mayormente en machos que en hembras, y esta misma tendencia prevalece entre hombre y mujer en el ser humano (Neira-Carrillo y Vásquez-Quitral, 2010).

En la formación del urolito existen distintas etapas, entre ellas se encuentran el crecimiento y la agregación de cristales CaOx (Boskey, 1981). El crecimiento ocurre cuando un núcleo cristalino ha alcanzado un tamaño crítico, y la sobresaturación relativa permanece por encima de 1 (Mullin, 1993). La agregación transcurre cuando los cristales de la solución se adhieren entre sí para formar partículas más grandes (Priya-Aggarwal *et al.* 2013).

Un factor importante en la formación de cálculos renales es la interacción primaria cristal CaOx-célula (Bigelow *et al.* 1997), y la consiguiente retención de cristales dentro del riñón (Tsujihata, 2008) facilitando con esto la formación de cálculos renales.

Por otro lado, la apoptosis de las células tubulares renales en respuesta al oxalato y a los cristales CaOx, puede jugar un rol importante en la urolitiasis. Cambios apoptóticos incluyen la exposición de la fosfatidilserina en la superficie celular. Agrupaciones de cabezas de fosfatidilserina cargadas negativamente atraen iones Ca^{2+} y pueden actuar como sitios de fijación de cristales a la superficie celular, promoviendo la nucleación del cristal CaOx. (Tsujihata, 2007).

Se cree que el desarrollo de cálculos renales requiere la formación de cristales en el fluido tubular, seguido por la retención de cristal y acumulación en el riñón (Verkolen y Verhulst, 2007). Tres hipótesis, modelos o vías para la formación y crecimiento de cálculos renales están siendo investigadas actualmente (ver Figura 2).

Hipótesis de partícula libre Establece que los núcleos cristalinos se forman por nucleación homogénea en el lumen de la nefrona bajo condiciones de un cambio de fase (aumento de la sobresaturación) en las sales disueltas presentes en el ultrafiltrado (Finlayson, 1978). Posteriormente, estos núcleos crecerían en tamaño y, eventualmente, serán albergados (retenidos) en el lumen de la nefrona distal, causando obstrucción de aquel segmento tubular. Obviamente, la formación de partículas libres podría ocurrir en el sistema colector renal a nivel del cáliz menor.

Hipótesis de partícula fija También requiere que se formen núcleos cristalinos en el lumen de la nefrona, los cuales, posteriormente se adhieren a la superficie apical del epitelio tubular (Finlayson, 1978, Kok y Khan, 2008). Si bien se han propuesto numerosos mecanismos para modelar el paso “adhesión cristal - célula”, el modelo citado más

comúnmente requiere injuria de células renales, probablemente resultado de niveles de oxalato tubular altos (Escobar *et al*, 2007). Una vez que se ha producido el paso anterior, los núcleos cristalinos se fijarían en posición y serían expuestos al ultrafiltrado potencialmente sobresaturado, que facilitaría aún más el crecimiento de estos cristales. Ambas teorías podrían resultar en la obstrucción de la nefrona y conducir a la calcificación intratubular, lesión conocida como nefrocalcinosis tubular (Verkolen y Verhulst, 2007). Randall (1940) describió la calcificación intraluminal (lesión papilar tipo II) o nefrocalcinosis en sólo 23 casos, y lo comparó con el hallazgo más común (204 casos) de placa intersticial (lesión papilar tipo I), colocando la lesión tipo II en una categoría diferente de la tipo I. Sin embargo, no está claro cómo la hipótesis de partículas libres o fija podría conducir a la formación de cálculos clínicos (i.e, una piedra en la pelvis renal lo suficientemente grande como para obstruir el uréter), salvo que sea el proceso de partícula libre o fijo, o ambos, se produce en el lumen de los conductos de Bellini y/o en la pelvis renal.

Hipótesis placa de Randall. Cristales en la orina se pueden adherir al sitio de depósitos cristalinos expuestos de fosfato de calcio intersticial (denominado placa de Randall), tras la pérdida de la cubierta urotelial normal de una papila renal (Figura 2). Un nido anclado de cristales urinarios se podría formar a partir de un crecimiento excesivo de la placa intersticial, potencialmente permitiendo que un cálculo fijo se forme y crezca durante años. Esta teoría muestra de manera explícita que los depósitos son sitios iniciales de estas lesiones. Randall (1940) examinó 1.154 pares de riñones cadavéricos, abriendo cuidadosamente la pelvis renal de cada riñón y examinando cada papila accesible con una lupa de mano. Este examen reveló una lesión "inocente" que consistía en una zona de color crema cerca de la punta papilar, que parecía estar bajo la superficie o sub-epitelial. Esta lesión se observó en el 20,5% del total de los riñones estudiados. Por microscopía de luz, se encontró que la lesión era una placa de sales de calcio, depositada en el tejido intersticial y definitivamente no intraluminal. El análisis químico de las regiones de la placa mostró calcio (Ca), nitrógeno (N), dióxido de carbono (CO₂) y fósforo (P). Luego, su principal observación fue el hallazgo de un cálculo pequeño (2 mm) que se proyectaba hacia el lumen de la pelvis renal. El cálculo se encontraba firmemente unido a un área de placa de calcio visible que estaba compuesta por fosfato de calcio. Se encontraron tales piedras

unidas a papilas en 65 riñones. Randall fue capaz de estudiar varios cálculos aun adheridos a la pared papilar, deduciendo que cálculos adheridos crecen a partir de una placa de calcio intersticial; (2) los sitios de la placa intersticial perderían su cubierta de células uroteliales, permitiendo que la placa quede expuesta la orina de los cálices, y (3) algunos cálculos desprendidos tienen una superficie cóncava con parches de fosfato (posiblemente representando el sitio de unión a la placa intersticial).

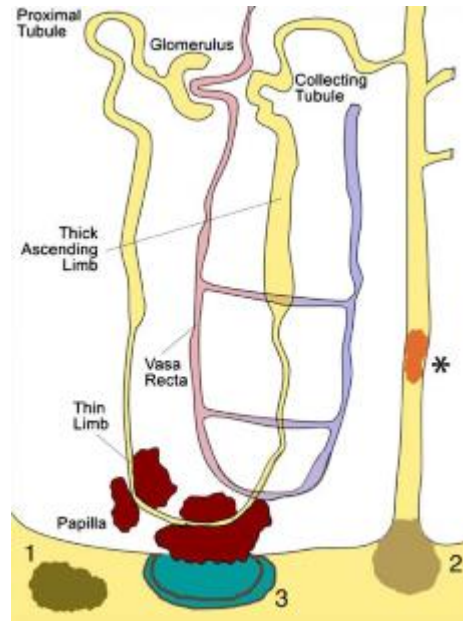


Fig 2. Vías de formación y crecimiento cristalino de los cálculos renales.

En la **Figura 2** se ilustran las tres vías de formación y crecimiento cristalino de CaOx de los cálculos renales, en la cual la primera vía (1) representa la formación partículas libres, ya sea en el sistema colector o a lo largo de la nefrona (asterisco). La segunda vía (2) implica la formación de núcleos cristalinos en el lumen de una nefrona (sitio de injuria celular), lo cual resulta en adhesión y crecimiento cristalino. En este modelo, la adhesión del cristal ocurre en la apertura del conducto de Bellini, y un tapón de material cristalino se proyecta hacia el interior del cáliz menor. La tercera vía (3) sugiere que los cristales en la orina pueden adherirse al sitio de depósitos cristalinos expuestos de fosfato de calcio intersticial, debido a la pérdida del urotelial normal (que recubre la papila renal).

Además, se ha reportado que la apoptosis de las células tubulares renales en respuesta al oxalato y a los cristales CaOx podría tener un rol importante en la urolitiasis

(Kim *et al.* 1996; Lieberthal *et al.* 1996; Lieberthal y Levine, 1996), cambios apoptóticos incluyen exposición de la fosfatidilserina en la superficie celular. Agrupaciones de cabezas de fosfatidilserina, cargadas negativamente, podrían atraer iones Ca^{2+} , y actuarían como sitios de nucleación y fijación de cristales CaOx a la superficie celular (Tsujihata, 2008).

Con el objeto de encontrar nuevos aditivos en la cristalización patológica recientemente diferentes investigadores han volcado sus investigaciones hacia estructuras de tamaño nanométrico, sin embargo existen pocos trabajos sobre el efecto ejercido por nanomateriales a base de carbono la cristalización de CaOx. En este contexto los nanotubos de carbono (CNT) podrían ser potenciales candidatos. (Wang y Liu, 2012)

Los CNT consisten básicamente en una lámina formada por átomos de carbono, dispuestos en un patrón hexagonal (similar al grafito), la cual posee dos ejes dentro de la escala nanométrica y una tercera escala que puede superar la micrométrica. (Wang y Liu, 2012)

Un CNT de pared simple (SWCNT) corresponde a una lámina de grafito cristalino enrollada sobre si misma hasta formar un cilindro, usualmente con un número pequeño de átomos alrededor de la circunferencia, y una gran longitud a lo largo del eje del cilindro. Por su parte, los CNT multipared (MWCNT) poseen las mismas características descritas para los SWCNT, sin embargo están formados por más de una capa. Los MWCNT son nanomateriales con excelentes propiedades biológicas, eléctricas, térmicas y mecánicas. (Wang y Liu, 2012)

Los MWCNT presentan diferentes aplicaciones como celdas solares, nanoelectrónica, emisores de efecto campo, catálisis, liberación de fármacos, diagnóstico y tratamiento de enfermedades, biosensores y materiales compuestos para la ingeniería de tejidos, materiales de soporte, etc. (Wang y Liu, 2012)

En el grupo del Dr. Neira-Carrillo se han aplicado MWCNT oxidados y funcionalizados con compuestos químicos portadores de grupos ácidos tales como ácido itacónico (AI), monometilitaconato (MMI) y monooctadecilitaconato (MODI) para mejorar tanto las propiedades mecánicas de polietilentereftalato (PET) (May-Pay *et al.*, 2012) como para modular la morfología, estructura y cinética de la cristalización para

CaCO₃, utilizando tanto la aproximación clásica como no clásica (Neira-Carrillo *et al.*, dato no publicado, 2014).

Una de las técnicas a emplear en este proyecto para evaluar el control ejercido por MWCNT sobre la mineralización de CaOx es la electrocristalización o también conocida como deposición electroforética (EPD). La electrocristalización permite funcionalizar moléculas, es decir agregar nuevas propiedades al material sintetizado (Chapman, 1974; Durnet, 1984; Chen y Tao, 2007). La electrocristalización es un proceso que consta de 2 etapas. En la primera, las partículas suspendidas en un líquido son forzadas a moverse hacia un electrodo de trabajo (WE) por la aplicación de un campo eléctrico en la suspensión (electroforesis). En la segunda etapa, las partículas se acumulan y forman un depósito uniforme en la superficie conductora del WE (Chapman, 1974; Durnet, 1984). La EPD puede ser aplicada a cualquier sólido en forma de polvo fino (<30 µm) o suspensión coloidal (Chapman, 1974; Durnet, 1984; Chen y Tao, 2007). Existen numerosos ejemplos de deposición de materiales, tales como: metales (Oniciu y Muresan, 1991; Tsai *et al.* 2002; Kushkhov *et al.* 2007; Peraldo *et al.* 2008; Gamburg y Zangari, 2011; Bozzini *et al.* 2012; García *et al.* 2013), polímeros (Usmani 1980; Beck 1988; Koa *et al.* 2002; Chen 2004; Gushin *et al.* 2009; Bazin *et al.* 2012; Sakurai *et al.* 2013; Cho *et al.* 2014), óxidos (Petit y Plichon, 1998; Peulon y Lincot, 1998; Casella 2002; Joseph y Kamath ,2008; Khrypunovet *et al.* 2011; Azaceta *et al.* 2012; Andersen 2012; Lee *et al.* 2014; Liu *et al.* 2014, Biswas *et al.* 2015), carburos (Elwell *et al.*, 1982; Kurt *et al.* 1990; Burzyńska *et al.* 2008; Pappacena *et al.* 2010; Malisheva *et al.* 2012; Malyshev *et al.* 2014), nitruros (Cao *et al.*, 2002; Chao *et al.* 2004; Li *et al.* 2004; Roy y Pal, 2005; Feng *et al.* 2006; Yang *et al.* 2012; Ibrahim *et al.* 2013; Mahdavi *et al.* 2015) y vidrios (Luo *et al.* 2010); los ejemplos más clásicos son oro (Ma *et al.*, 2009; Sakai *et al.* 2009; Kohl, 2010; Li *et al.*, 2011; Karoonian *et al.*, 2012), cobre (Kekesi y Isshiki, 1999; Grujicic y Pesic, 2002; Liu *et al.*, 2008; Dini y Snyder, 2010; Ballesteros *et al.* 2011; Florence *et al.*, 2011) y níquel (Gómez *et al.* 1995; Goods *et al.*, 2005).

Se han descrito dos tipos de EPD dependiendo de las características del electrodo donde ocurre la deposición. Cuando las partículas están cargadas positivamente, la deposición ocurre en el cátodo, y el proceso lleva por nombre EPD catódica. La deposición

de partículas cargadas negativamente en el electrodo positivo (ánodo) se conoce como EPD anódica. Si se modifica adecuadamente la carga de superficie de las partículas, cualquiera de los tipos de EPD es posible (Besra y Liu, 2007). Se ha demostrado la capacidad de EPD de varios materiales en películas delgadas desde soluciones acuosas (Chapman, 1974; Durnet, 1984; Chen y Tao, 2007), ejemplos de lo anterior son: nanofibras de quitosano con polioximetato (Shan *et al.* 2007) y películas poliméricas de polietilamina (DaSilva *et al.* 2009). Los WE usados para esta técnica son de superficies de carbono u óxido (Chapman, 1974; Durnet, 1984; Chen y Tao, 2007), por ejemplo el óxido de indio estaño (ITO). De esta manera, la corriente catódica total disminuye, y puede ser seguida por medidas cronopotenciométricas. La corriente censada por el electrodo de referencia (RE) puede ser analizada según su variación en el tiempo, siendo posible identificar, el momento aproximado en el cual la superficie del WE es cubierta totalmente por el depósito de cristales CaOx, mediante la obtención de curvas cronopotenciométricas (Ketrane *et al.* 2009).

HIPÓTESIS

Nanotubos de carbono multipared (MWCNT) funcionalizados con grupos químicos similares a inhibidores naturales actuarían como moduladores de la cristalización de CaOx en ensayos de electrocristalización *in vitro*.

OBJETIVO GENERAL

Preparar y evaluar el efecto de MWCNT funcionalizados como aditivos en la cristalización *in vitro* de CaOx usando la técnica de electrocristalización.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener y caracterizar MWCNT funcionalizados con grupos funcionales ácidos y ésteres.
2. Evaluar el efecto de MWCNT funcionalizados como aditivos en ensayos de electrocristalización de CaOx *in vitro*.
3. Determinar la morfología, microanálisis elemental y polimorfismo de los cristales CaOx mediante microscopía óptica (MO) y electrónica de barrido (SEM), dispersión por energía dispersiva de rayos X (EDX) y difracción de rayos X (XRD), respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtener y caracterizar MWCNT funcionalizados con grupos funcionales ácidos y ésteres.

1.1 Oxidación de nanotubos de carbono (CNTs).

Inicialmente para obtener una solución única de ácido nítrico y sulfúrico al 3.0 M, se utilizan 206.45 ml de ácido nítrico y 163.34 ml de ácido sulfúrico.

Se obtuvieron las cantidades antes mencionadas de ácidos utilizando una probeta graduada de 250 ml. Posteriormente se vertió agua destilada (aprox. 300 ml) en un matraz aforado de 1000 ml en un baño de agua-hielo. A continuación se dispersó de forma lenta y con movimientos de agitación el ácido nítrico en el matraz aforado para hacer homogénea la mezcla. Posteriormente se vertió de la misma manera el ácido sulfúrico en el matraz aforado. Finalmente se completan los 1000 ml en el matraz aforado con agua destilada.

La mezcla de ácidos-agua se dejó reposar por 24 h, para estabilizar la mezcla y nuevamente se completa los 1000 ml con agua destilada. Posteriormente con esta mezcla se realizó la oxidación de los CNTs. Una vez preparado la solución de ácido nítrico/ácido sulfúrico/agua destilada. Se procedió a pesar 0.3 g de CNTs. A continuación, en un vaso de precipitado de 80 ml se colocó los CNTs y 70 ml de la solución de ácidos y agua, para posteriormente agitarlos mecánicamente en una placa de calentamiento por 15 min a 60°C y mantener la mezcla homogénea. Seguidamente dicha solución se dispersó en un baño sónico por 2 h. Finalmente la solución se filtró y lavó con agua destilada, a continuación los CNTs fueron secados en una estufa de vacío por 24 h a 100°C.

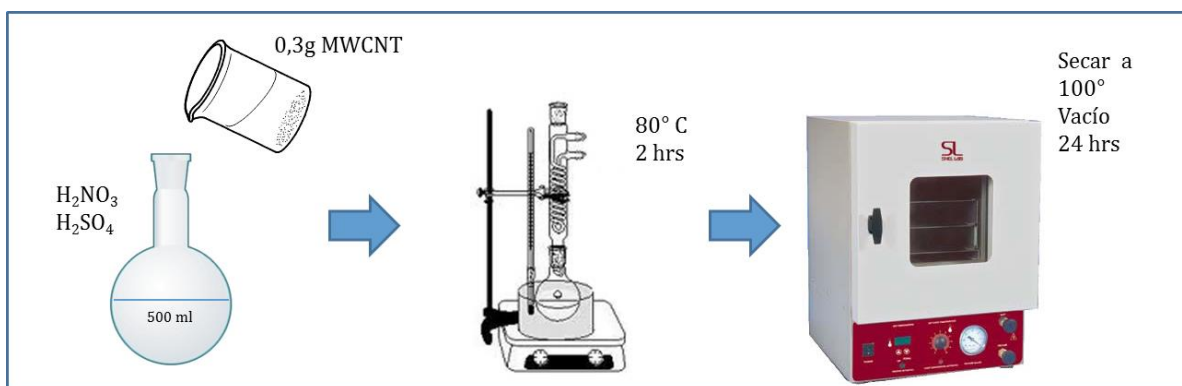


Fig 3. Reacción de oxidación de MWCNT.

1.2. Adición de grupos ácidos a los MWCNT oxidados.

La funcionalización de los MWCNT-Ox se realizó mediante la incorporación de grupos carboxilos, la cual mejora su grado de aglomeración y dispersión en soluciones acuosas, obteniéndose suspensiones estables que, a su vez, permiten conjugarlos con péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y agentes terapéuticos. La funcionalización de los MWCNT-Ox con ácido itacónico (IA), monometilitaconato (MMI) y monooctadecilitaconato (MODI) se realizó a cabo mediante la dispersión de 0,2 g de MWCNT-Ox en 20 mL de acetona en un baño de ultrasonido por 5 min. Luego el producto es puesto en un matraz de 500 mL, al cual se le agregaron 2 g de IA o MMI y 80 mL de acetona, a los que finalmente se agregará 0.3 g de ácido p-toluenosulfónico (TsOH) como catalizador, la mezcla resultante se llevó a reflujo por 3 h a 60 °C. Terminado el tiempo de reflujo, los MWCNT-AI y MWCNT-MMI fueron separados por filtración al vacío y lavados con abundante acetona para remover el exceso de AI y/o MMI no reaccionado y finalmente, los MWCNT funcionalizados se secaron al vacío a 70 °C por 24 h. (Miranda, 2010)

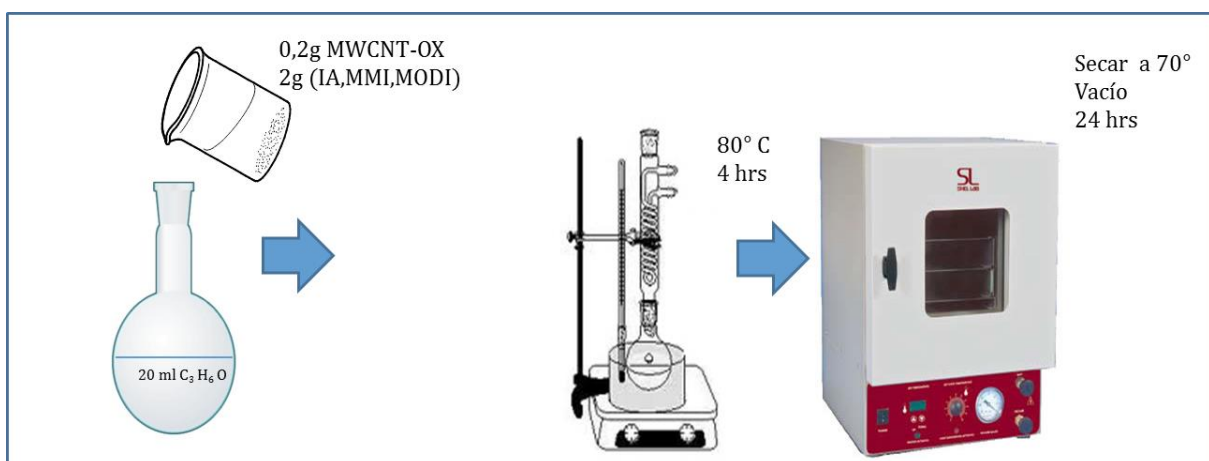


Fig 4. Reacción de Funcionalización de MWCNT-OX con ácidos y ésteres derivados IA, MMI y MODI.

1.3 Los MWCNT-Ox y funcionalizados caracterizados mediante FTIR/ATR.

FTIR/ATR es una técnica que permite determinar grupos funcionales químicos contenidos en una molécula o compuesto macromolecular. Esta técnica permitió por un lado comprobar la síntesis de los nuevos MWCNT funcionalizados y mediante los patrones de absorción de luz infrarroja característicos de los polimorfos de CaOx, conocer los polimorfos COD y COM. El equipo de FTIR/ATR utilizado fue un Interspectrum Interspec p/n 200-X (FTIR-ATR).

2. Evaluar el efecto de MWCNT funcionalizados como aditivos en ensayos de electrocristalización de CaOx in vitro.

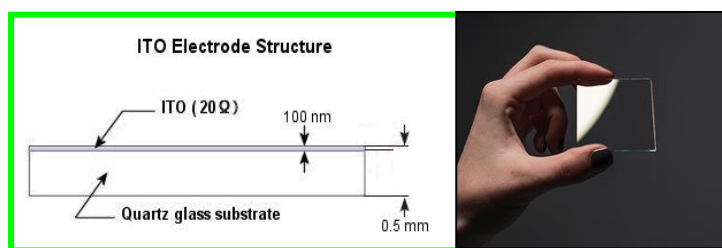


Fig 5. Características técnicas de los sustratos ITO: 25 x 25 x 1,1 mm. Limited, Loveland CO 80537-5059 Made in USA.

Para los ensayos electroquímicos (EEQ) los sustratos ITO deben ser preparados de la siguiente forma:

- 1- Los sustratos ITO tienen forma cuadrada (25mm x 25mm). Cada sustrato ITO se corta en dos, obteniendo dos trozos de 25 mm x 12,5 mm.
- 2- El corte de los sustratos ITO debe ser realizado con guantes, bajo una superficie limpia. Idealmente con papel abajo para que los restos pequeños puedan ser eliminados fácilmente.
- 3- El corte es realizado con un lápiz punta de diamante sobre el lado conductor del sustrato ITO, identificado anteriormente con un tester y marcado con un lápiz en un extremo del lado, dejando intacta la superficie que no está siendo expuesta al corte.
- 4- Poner un par de gotas de solución grafito en la parte superior del sustrato ITO. Luego, insertar cables con los terminales de cobre expuestos (de 5-7 cm), de manera

que uno de los terminales interactúe con el grafito depositado. Dejar secar. Reforzar esta unión con una gota de grafito tapando toda la conexión. Dejar secar.

- 5- Aplicar sobre la conexión grafito-cobre una película de esmalte de uñas transparente para aislar. Dejar secar. Si la superficie no es conductora la pantalla mostrará el valor de 1 o equivalente, según la escala (1.00, 0.001, etc.). Si la superficie es conductora la pantalla mostrará un valor que puede ir desde 0,15 a 0,40 (o equivalente).
- 6- Posteriormente, los electrodos ITO son puestos en vasos precipitados de 10 o 25 ml y lavados con metanol en un baño sonicador durante 5 min, “setear” el baño a 25 °C y potencia intermedia. Luego, repetir el mismo procedimiento pero esta vez con agua Mili Q obtenida de un sistema de purificación de agua LaboStar TM 4-DI/UV.

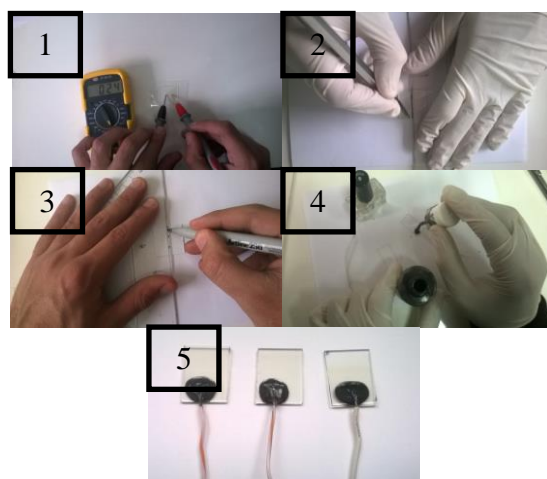
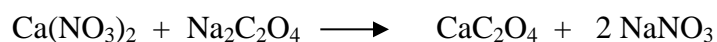


Fig 6. Esquema experimental de preparación de los sustratos ITO.

La solución de cristalización consiste en una mezcla de: nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) 50 mM, oxalato de sodio ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) 50 mM y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 75 mM en volúmenes iguales. De esta forma la reacción de electrocristalización transcurre según la siguiente ecuación:



El cual debe ajustarse en el rango de 5 – 13 unidades de pH, agregando gotas de una solución de hidróxido de sodio (NaOH). Posteriormente agregar el mismo volumen de ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) 50 mM.

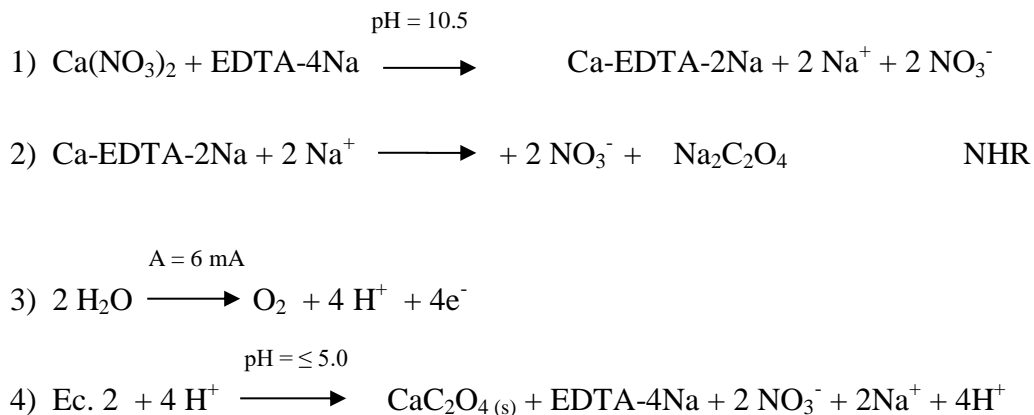
**El EDTA es usado para complejar los iones de calcio. El complejo Ca^{2+} -EDTA tiene una constante de estabilidad alta ($pK= 10,59$ a $pH=7$), por lo tanto se suprime la precipitación del CaOx en el rango de pH 5-13.*

* El uso de un agente complejante provee un método por el cual el Ca^{2+} libre en la solución se puede ajustar finamente variando la razón $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{EDTA}]$. La deposición de CaOx es inducida por una disminución del pH. El pH ácido es generado en el ánodo por cuenta del oxígeno – un fenómeno llamado “electrogeneración de ácido”. La constante de estabilidad del complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{EDTA}$ disminuye a medida que el pH se vuelve más ácido, conduciendo a la liberación de iones Ca^{2+} por la hidrólisis ácida del complejo. De esta manera, los iones Ca^{2+} libres precipitan como CaOx. Así como el pH va cambiando en las inmediaciones del ánodo, el CaOx es depositado en éste en la forma de un recubrimiento cristalino.

Los cristales CaOx fueron formados mediante cronopotenciometría que permite depositar cristales localizados en la superficie conductora del WE. Esta técnica se basa en el estudio de la variación del potencial eléctrico a través del tiempo en el ET, luego de la aplicación de una corriente constante (cc) (Joseph y Kamath, 2010). Las celdas electroquímicas (CEQ) usadas en los ensayos de electrocristalización (EEC) fueron lavados con solución piraña, etanol y acetona.

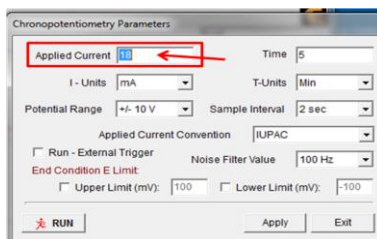
Luego, un volumen de 30 mL de la solución anterior, fue puesto en una ECC de vidrio con tres compartimentos. Es necesario esperar un par de segundo para que la solución alcance cada uno de los compartimentos. Luego, se procedió a sellar las principales aberturas de la CEQ, y se insertaron los tres electrodos (AE, RE, WE). Finalmente, se conectaron todos los electrodos a la estación electroquímica para iniciar los EEC.

La reacción de electrocristalización transcurre según el siguiente esquema:

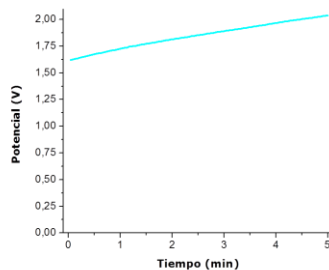


Protocolo de electrocristalización:

- 1- Conectar todos los electrodos con el cable que los une al Potenciostato-Galvanostato: cable blanco (unir al RE), cable rojo (unir al AE) y cable negro (unir al WE).
- 2- Encender el equipo Potenciostato-Galvanostato.
- 3- Abrir el programa EpsilonEC-USB “ubicado” en el escritorio del computador conectado al Potenciostato-Galvanostato.
- 4- Asegurarse que la conexión entre el equipo y el computador esté operativa. Al abrir el programa saldrá una ventana que indica la conexión, la que desaparece luego de unos seg. Si la conexión no es exitosa, la ventana continuará abierta (*CS LINK Dialog: Cannot initialize Epsilon*). En ese caso debe cerrar el programa y abrirlo nuevamente.
- 5- Ir al botón *File – New*. Seleccionar *Galvanostat- DEMO Chronopotentiometry (CP)*.
- 6- Ingresar los siguientes parámetros (considerar que aún está en período de prueba el valor de la corriente aplicada):



7- El gráfico a obtener relaciona el potencial vs. el tiempo. Ejemplo:



8- Sacar el WE de la solución, dejar secar en estufa a temperatura constante, evitando su exposición a polvo. Rotularlo para luego ser observado por SEM.

Importante: En todos los ensayos electroquímicos deben registrarse de modo detallado las unidades de potencial y/o corriente de los gráficos entregados por el equipo, para evitar confusiones posteriores en el tratamiento de los datos.

3. Determinar la morfología, microanálisis elemental y polimorfismo de los cristales CaOx mediante microscopía óptica (MO) y electrónica de barrido (SEM), dispersión por energía dispersiva de rayos X (EDX) y difracción de rayos X (XRD), respectivamente.

MICROSCOPIA ÓPTICA (MO).

Se obtuvieron imágenes de cristales CaOx electrodepositados sobre los sustratos ITO en un instrumento Nikon Eclipse E400. Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital Nikon, conectada directamente al instrumento. Las imágenes fueron obtenidas usando un tiempo de exposición de 40 ms a 40X y 300 ms a 100X, además se ocupó una ganancia de 10× en ambas magnificaciones.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).

La morfología de los cristales CaOx obtenidos en los distintos EEC fueron estudiadas en un microscopio electrónico de barrido FEI Inspect F50. Para ello, los electrodos ITO con cristales CaOx electrodepositados fueron secados a temperatura ambiente y sombreados con una capa de oro ultrafina (12 nm) en un instrumento Sputter-EMS-550 (Electron Microscopy Science). Además, la morfología de los cristales de CaOx

eventualmente fue analizada en un microscopio Hitachi TM3030. Este SEM posee un dispositivo que permitió determinar la composición elemental de la superficie de los cristales CaOx (EDS) con el objeto de realizar una determinación cualitativa de los cristales de CaOx.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) ACOPLADO A ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X (SEM/EDS).

La estructura, morfología y tamaño de los cristales CaOx obtenidos en los distintos ensayos fue estudiada en un microscopio SEM de sobremesa Hitachi TM3030 (Hitachi High Tech). Instrumento acoplado a un microanalizador de energía dispersiva de rayos X (EDS) Quantax (Brucker, Germany). Este SEM posee un dispositivo que permitió determinar la composición elemental de la superficie de los cristales CaOx (EDS) y realizar un mapeo de XRD por elementos, la cual representa una distribución elemental individual de átomos como Ca, C, O constitutivos de los cristales de CaOx en un área seleccionada de la muestra cristalina.

DIFRACCIÓN DE RAYOS X (XRD)

Esta técnica permitió la identificación cualitativa de la composición mineralógica de una muestra cristalina. De esta manera, fue posible reconocer estructuralmente los distintos polimorfos obtenidos durante los EEC para CaOx. XRD está basada en la interferencia óptica que se produce cuando una radiación monocromática atraviesa una rendija de espesor comparable a la longitud de onda de la radiación. Los resultados fueron mostrados en difractogramas de coordenadas U.I vs. 2θ , los cuales se compararon comparados con difractogramas estándares de cada polimorfo de los cristales CaOx usando la base de datos teóricos PCDFWIN. Los difractogramas de XRD fueron obtenidos con un instrumento Siemens D-5000 con radiación $\text{CuK}\alpha$ perteneciente a la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile.

RESULTADOS

1. Obtener y caracterizar MWCNT funcionalizados con grupos funcionales ácidos y ésteres.

Se utilizó espectroscopía FTIR para confirmar la presencia de grupos funcionales hidroxilos (-OH) y carboxilos (-COOH); como también ácido itacónico (IA), monometilitaconato (MMI) o monoctadecilitaconato (MODI) sobre la superficie de MWCNT oxidados y funcionalizados, respectivamente (Figura 7).

En el espectro de MWCNT prístinos (línea negra), la banda de absorción ubicada a 3625 cm^{-1} corresponde a los grupos O-H de moléculas de agua adsorbidas sobre los CNT, y a bandas de absorción debido a vibraciones de deformación de la cadena CNT-OH, respectivamente. Además, se observan bandas de absorción a 996 cm^{-1} que corresponderían a las vibraciones de estiramiento de los enlaces C=C presentes en los MWCNT, así como también bandas de absorción a 2980 cm^{-1} que corresponderían a las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-H.

Los MWCNT-Ox (línea roja) muestran bandas de absorción nuevas respecto al espectro FTIR de MWCNT, explicadas principalmente por la presencia de grupos -OH y -COOH. Bandas de absorción alrededor de 3700 cm^{-1} y 988 cm^{-1} se atribuyen a vibraciones de estiramiento y de flexión, respectivamente en los enlaces O-H. Las bandas de absorción observadas a 1772 cm^{-1} y 1534 cm^{-1} se asignan a los vibraciones de estiramiento en los enlaces C=O y C-O en grupos carboxilos, respectivamente confirmando la presencia de grupos -OH y -COOH sobre la superficie de CNT.

El espectro de MWCNT-IA (línea azul) muestra bandas de absorción adicionales en la región de 1392 cm^{-1} debido a las vibraciones de estiramiento de grupos -COOH. Además, se observan bandas de absorción a 1145 cm^{-1} debido a las vibraciones de estiramiento para los enlaces C=C del enlace doble vinil del IA. Bandas de absorción alrededor de 1068 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de flexión de enlaces O-H. Se observan bandas de absorción alrededor de 950 cm^{-1} correspondientes a vibraciones de estiramiento para enlaces C-O, la que se resuelve de forma más precisa y con mayor intensidad para MWCNT funcionalizados con IA.

En el espectro FTIR de MWCNT-MMI (línea verde oscura) se observa la aparición de bandas de absorción a 2982 cm^{-1} atribuibles a vibraciones de estiramiento para enlaces C=O en los ácidos carboxílicos y ésteres, respectivamente. Nuevamente, aparece la banda de absorción a 2339 cm^{-1} debido a las vibraciones de estiramiento de los enlaces C=C del enlace doble vinil del MMI. Finalmente, se observan bandas de absorción alrededor de 1384 cm^{-1} y 989 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones de flexión para enlaces O-H y vibraciones tensión para enlaces C-O, respectivamente.

En el espectro FTIR de MWCNT-MODI (línea calipso oscura) se observa la aparición de bandas de absorción a 2980 cm^{-1} y 2883 cm^{-1} atribuibles a vibraciones de estiramiento para enlaces C=O en los ácidos carboxílicos y ésteres, respectivamente. Nuevamente, aparece la banda de absorción a 2663 cm^{-1} debido a las vibraciones de estiramiento de los enlaces C=C del enlace doble vinil del MODI. Finalmente, se observan bandas de absorción alrededor de 1377 cm^{-1} y 943 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones de flexión para enlaces O-H y vibraciones tensión para enlaces C-O, respectivamente.

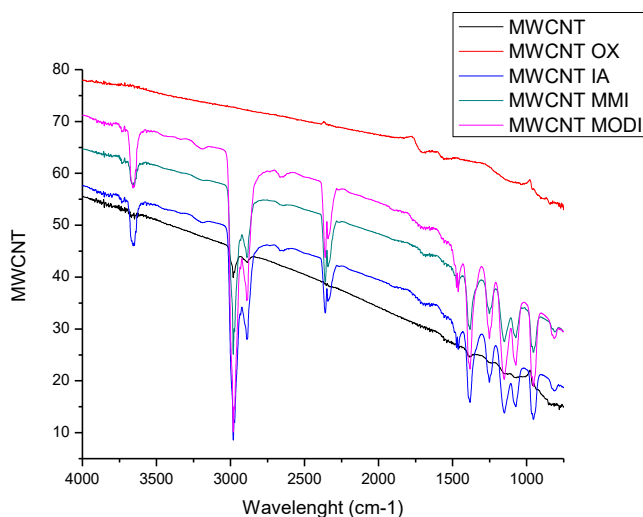


Fig 7. Espectro FTIR de nanotubos de carbono oxidados y funcionalizados:

a) MWCNT, b) MWCNT-Ox, c) MWCNT-IA, d) MWCNT-MMI y e) MWCNT-MODI.

2. Evaluar el efecto de MWCNT funcionalizados como aditivos en ensayos de electrocristalización de CaOx *in vitro*.

Se realizaron 54 EEC para CaOx, modificando la corriente aplicada (C.A) desde 1 mA hasta 24 mA (1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24), a 23 °C, 37 °C y 60 °C, en Sistema Abierto (SA) y Sistema Cerrado (SC). El SA se encuentra por completo en contacto al medio externo y el SC se encuentra parcialmente aislado mediante parafilm la apertura donde se deposita el electrodo. La denominación de SA y SC corresponde a la restricción sería el libre paso de aire entre el electrodo y el medio externo.

Se prepararon las siguientes soluciones: ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 75M, nitrato de calcio ($\text{Ca}[\text{NO}_3]_2$) 50M y oxalato de sodio ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) 50M. Primero se mezclaron las soluciones de $\text{Ca}[\text{NO}_3]_2$ y EDTA, se midió el pH en un instrumento 330i WTW, luego se ajustó pH a 10,5 mediante la adición de algunas gotas de NaOH 1M. Se utilizaron electrodos de trabajo preparados en el laboratorio, a base de trozos de aluminosilicato; 1 hilo de platino enrollado, como electrodo auxiliar; y 1 electrodo de referencia plata cloruro plata (Ag/ClAg). La temperatura de trabajo deseada fue alcanzada mediante uso de un baño termostático, el cual consistió en poner un recipiente de vidrio abierto de 2000 ml sobre un agitador con control de temperatura IKA® RH-KT/C.

Como técnica de electrocristalización se utilizó Cronoamperometría en un galvanostato/Potenciostato Epsilon BASi. El rango de potencial utilizado fue ± 10 V, con un intervalo de muestra de 2 seg y convención de corriente IUPAC.

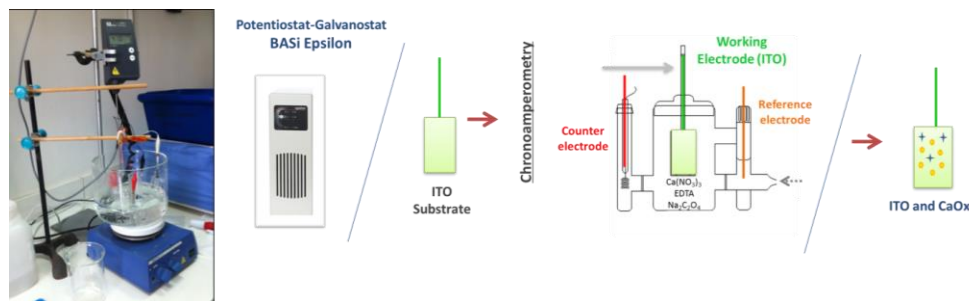


Fig 8. Diseño experimental y celda electroquímica utilizada.

Se analizaron los resultados para la generación de un protocolo adecuado para la obtención de parámetros electroquímicos y la síntesis selectiva de cristales, COM y COD respectivamente. En las siguientes tablas (**Tabla 1 y 2**) se visualizan las variables utilizadas en el experimento.

Tabla 1. Diseño experimental por C.A según tipo de sistema electroquímico (SA y SC) y Temperatura.

<i>Sistema electroquímico</i>	<i>Corriente (mA)</i>	1 mA	3 mA	6 mA	9 mA	12 mA	15 mA	18 mA	21 mA	24 mA
	<i>Temperatura °C</i>									
SA	23	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	37	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	60	X	X	X	X	X	X	X	X	X
SC	23	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	37	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	60	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Tabla 2. Temperaturas en C° obtenidas del experimento por C.A según tipo de Sistema electroquímico voltaje aplicado (+/- 1C°).

Corriente eléctrica	1 mA	3 mA	6 mA	9 mA	12 mA	15 mA	18 mA	21 mA	24 mA
Sistema electroquímico									
SA	23,6	22,8	22,7	23,4	23,4	22,9	22,6	23,6	22,6
SA	37,1	36,7	37,4	36,8	36,4	36,9	36	37,1	36,2
SA	60,7	59,4	59,6	59,6	60,7	59,9	59,2	59,3	60,9
SC	23,1	23,1	23,5	23,8	22,1	23,1	23,2	22,9	23,4
SC	37,5	36,9	37,2	36,7	37,2	36,6	37,2	36,8	37,1
SC	60,2	59,2	59	59	59,1	61	59,3	59,3	60,9

Se obtuvieron gráficos de curvas electroquímicas (CE) que corresponden al protocolo utilizado anteriormente.

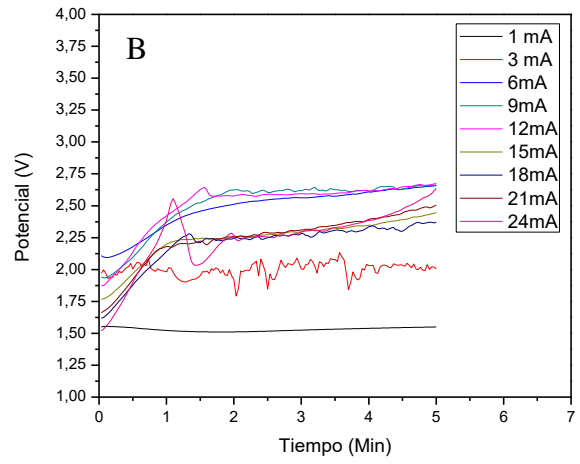
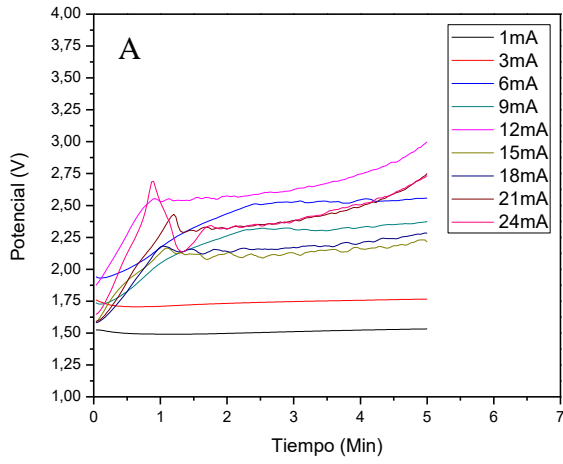


Fig 9. Gráficos según potencial aplicado a 23° C en SA (A) y SC (B).

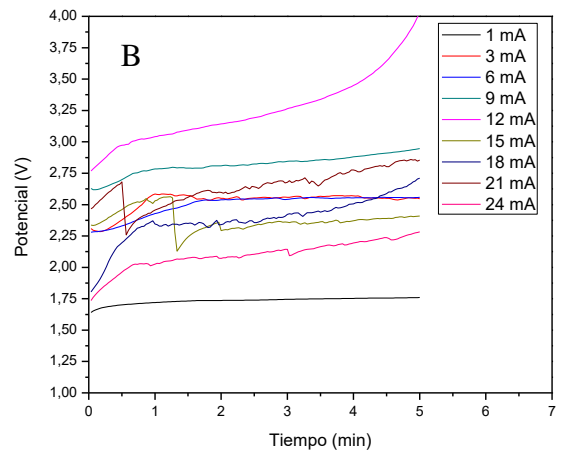
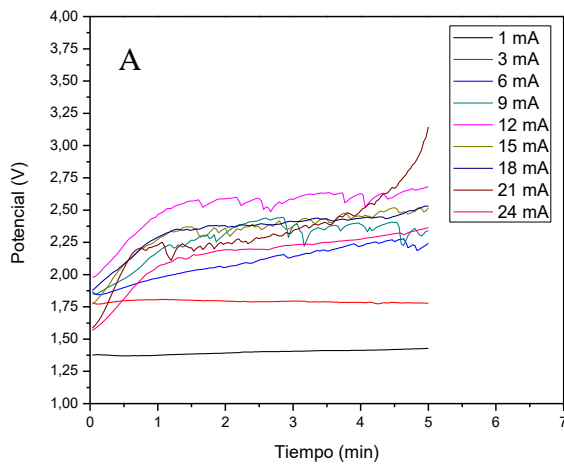


Fig 10. Gráficos según potencial aplicado a 37° C en SA (A) y SC (B).

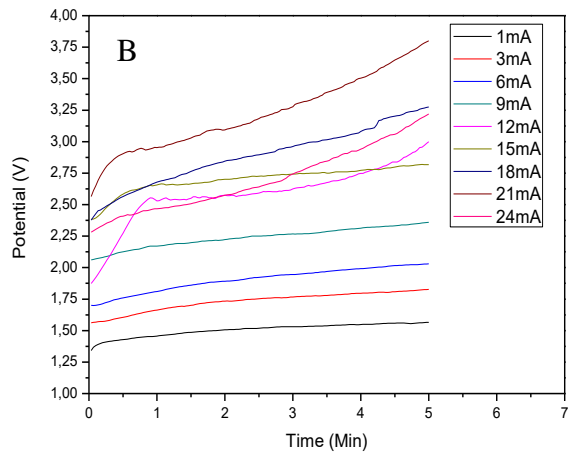
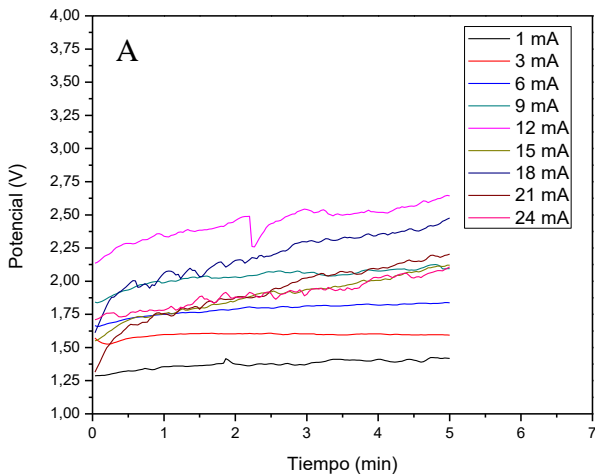


Fig 11. Gráficos según potencial aplicado a 60° C en SA (A) y SC (B).

Tabla 3. Cronopotenciometrías obtenidas en los sistemas SA (A) y SC (C), 23°C, 37°C y 60°C y corrientes de 1-24 mA.

S	C.A. mA	23 °C			37 °C			60 °C		
		C.P. 0 min	C.P. 3 min	C.P. 5 min	C.P. 0 min	C.P. 3 min	C.P. 5 min	C.P. 0 min	C.P. 3 min	C.P. 5 min
A	1	1,524 V	1,511 V	1,533 V	1,376 V	1,405 V	1,427 V	1,287 V	1,372 V	1,418 V
A	3	1,759 V	1,746 V	1,766 V	1,781 V	1,794 V	1,778 V	1,572 V	1,603 V	1,593 V
A	6	1,941 V	2,524 V	2,556 V	1,867 V	2,144 V	2,242 V	1,665 V	1,813 V	1,836 V
A	9	1,737 V	2,322 V	2,373 V	1,850 V	2,387 V	2,340 V	1,841 V	2,065 V	2,094 V
A	12	1,874 V	2,625 V	2,999 V	1,980 V	2,610 V	2,680 V	2,135 V	2,535 V	2,614 V
A	15	1,584 V	2,121 V	2,213 V	1,770 V	2,386 V	2,518 V	1,315 V	2,002 V	2,203 V
A	18	1,941 V	2,526 V	2,556 V	1,875 V	2,407 V	2,530 V	1,611 V	2,305 V	2,476 V
A	21	1,590 V	2,379 V	2,751 V	1,585 V	2,352 V	3,145 V	1,315 V	2,024 V	2,203 V
A	24	1,646 V	2,368 V	2,735 V	1,568 V	2,230 V	2,363 V	1,709 V	1,924 V	2,107 V
C	1	1,548 V	1,525 V	1,550 V	1,641 V	1,744 V	1,759 V	1,342 V	1,530 V	1,565 V
C	3	1,970 V	2,002 V	2,005 V	2,308 V	2,564 V	2,546 V	1,561 V	1,763 V	1,826 V
C	6	2,108 V	2,562 V	2,658 V	2,278 V	2,551 V	2,557 V	1,700 V	1,945 V	2,029 V
C	9	1,942 V	2,624 V	2,662 V	2,629 V	2,845 V	2,946 V	2,061 V	2,266 V	2,359 V
C	12	1,872 V	2,593 V	2,672 V	2,768 V	3,273 V	4,033 V	1,874 V	2,625 V	2,999 V
C	15	1,942 V	2,629 V	2,662 V	2,336 V	2,363 V	2,409 V	2,383 V	2,742 V	2,818 V
C	18	1,618 V	2,282 V	2,370 V	1,804 V	2,427 V	2,710 V	2,376 V	2,956 V	3,275 V
C	21	1,661 V	2,315 V	2,504 V	2,466 V	2,676 V	2,855 V	2,563 V	3,302 V	3,800 V
C	24	1,518 V	2,276 V	2,633 V	1,736 V	2,143 V	2,282 V	2,281 V	2,699 V	3,219 V

S: Sistema; C.A.: Corriente Aplicada; T: Temperatura; C.P: Cronopotenciometría.

Posteriormente se realizaron 8 (16) C.P. CaOx, las cuales fueron realizados a 9 mA a 37 y 60 °C, en SC en presencia de citrato, IA, MMI y MODI Las variables experimentales temperatura y corriente tendrían efectos sobre la cinética de cristalización de CaOx.

La concentración utilizada corresponde a 0,03 mg/ml de cada aditivo en suspensión. (Citrato, IA, MMI y MODI).

Corriente	Control	Citrato	IA	MMI	MODI
37°	37	37	37	37	37
60°	60	60	60	60	60

Corriente	Control	Citrato	IA	MMI	MODI
37°	37,5	37,1	35,9	37,8	36,9
60°	60,2	60,9	59,6	59,6	59,3

Tabla 4. Diseño experimental y temperaturas obtenidas en presencia de aditivos (Citrato, IA, MMI, MODI).

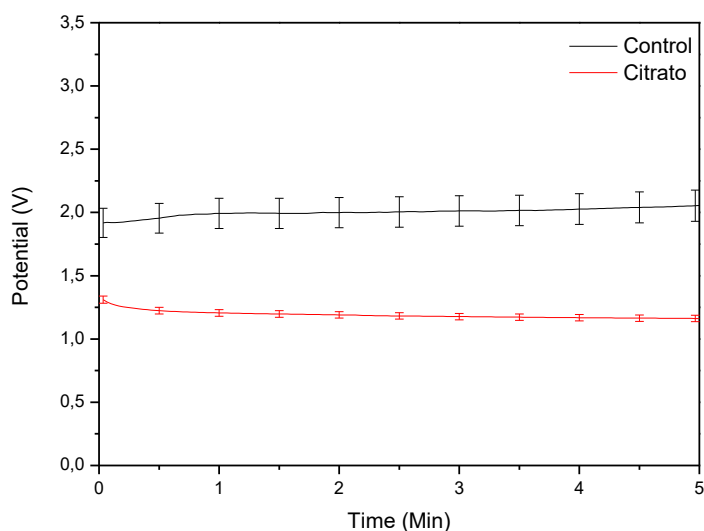


Fig 12. Curva de respuesta potenciométrica versus tiempo de citrato sobre la cristalización de CaOx al aplicar 9 mA en SC (C) a 37° C con sus respectivas desviaciones estándar en promedio.

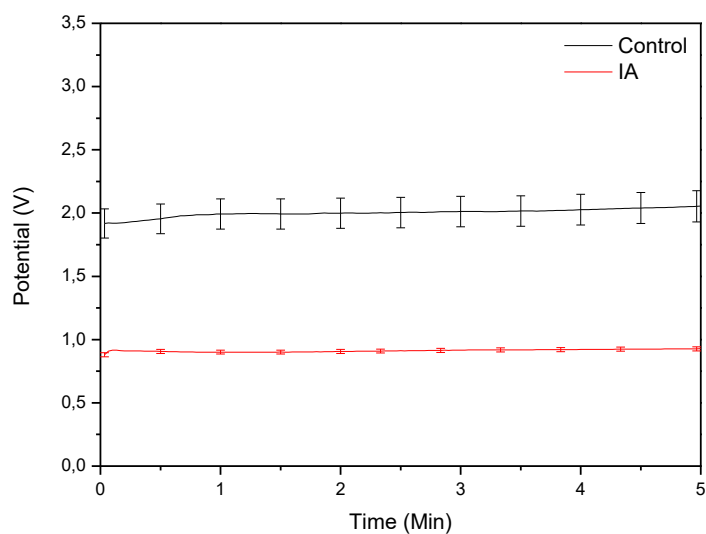


Fig 13. Curva de respuesta potenciométrica versus tiempo de IA sobre la cristalización de CaOx al aplicar 9 mA en SC (C) a 37° C con sus respectivas desviaciones estándar en promedio.

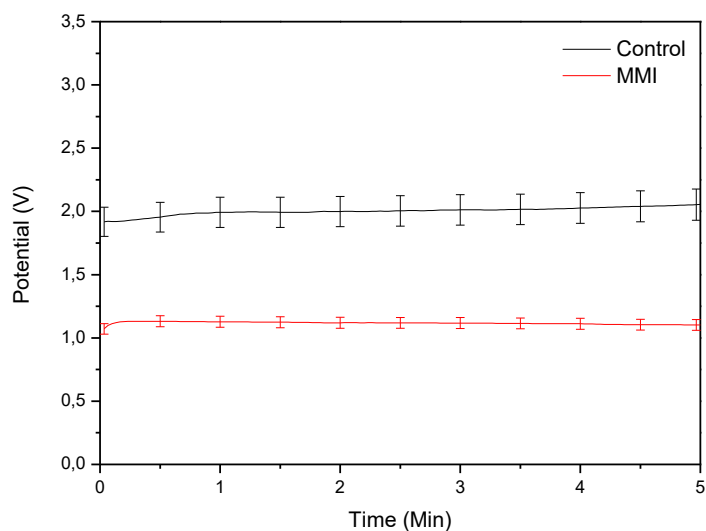


Fig 14. Curva de respuesta potenciométrica versus tiempo de MMI sobre la cristalización de CaOx al aplicar 9 mA en SC (C) a 37° C con sus respectivas desviaciones estándar en promedio.

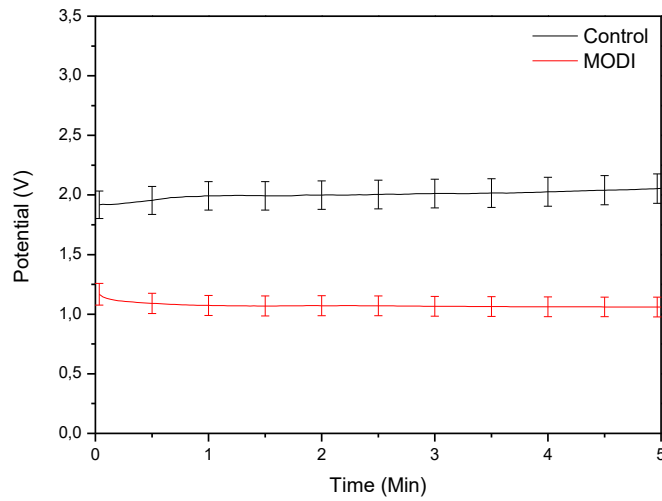


Fig 15. Curva de respuesta potenciométrica versus tiempo de MODI sobre la cristalización de CaOx al aplicar 9 mA en SC (C) a 37° C con sus respectivas desviaciones estándar en promedio.

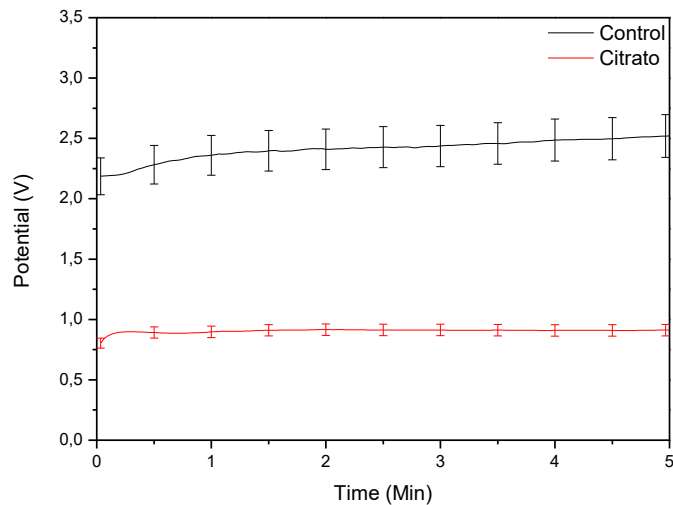


Fig 16. Curva de respuesta potenciométrica versus tiempo de citrato sobre la cristalización de CaOx al aplicar 9 mA en SC (C) a 60° C con sus respectivas desviaciones estándar en promedio.

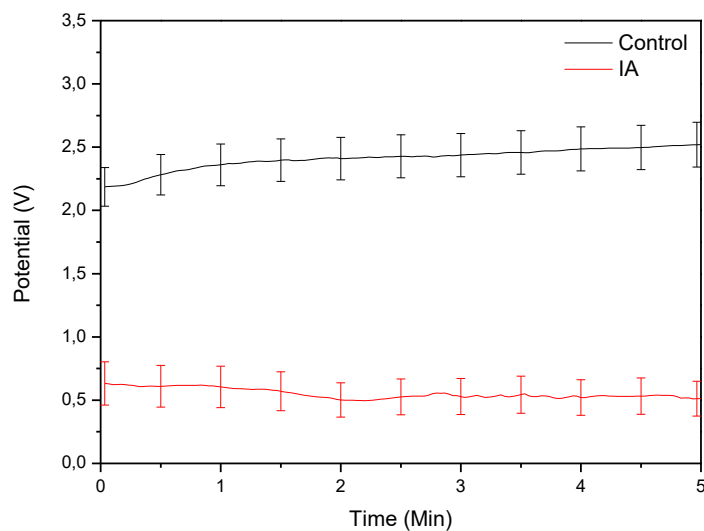


Fig 17. Curva de respuesta potenciométrica versus tiempo de IA sobre la cristalización de CaOx al aplicar 9 mA en SC (C) a 60° C con sus respectivas desviaciones estándar en promedio.

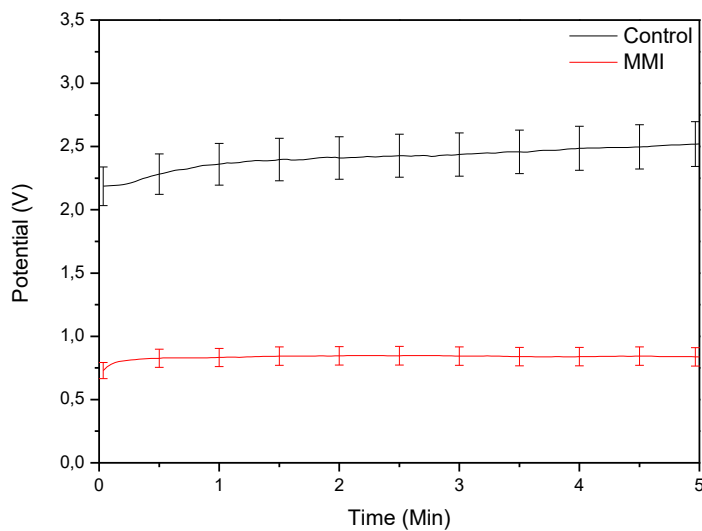


Fig 18. Curva de respuesta potenciométrica versus tiempo de MMI sobre la cristalización de CaOx al aplicar 9 mA en SC (C) a 60° C con sus respectivas desviaciones estándar en promedio.

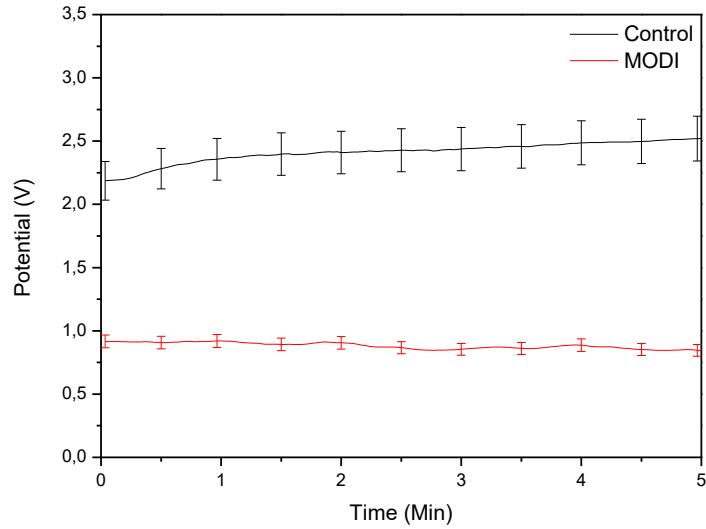


Fig 19. Curva de respuesta potenciométrica versus tiempo de IA sobre la cristalización de CaOx al aplicar 9 mA en SC (C) a 60° C con sus respectivas desviaciones estándar en promedio.

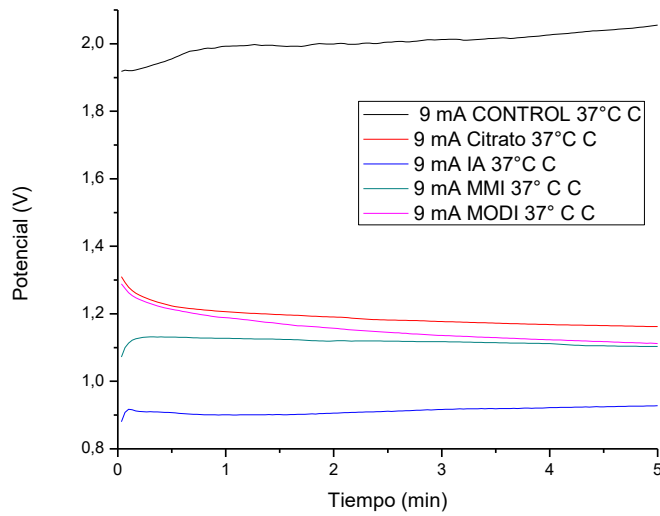


Fig. 20. Gráfico de referencia del efecto de diferentes aditivos sobre la cristalización de CaOx al aplicar 9 mA en SC (C) a 37° C.

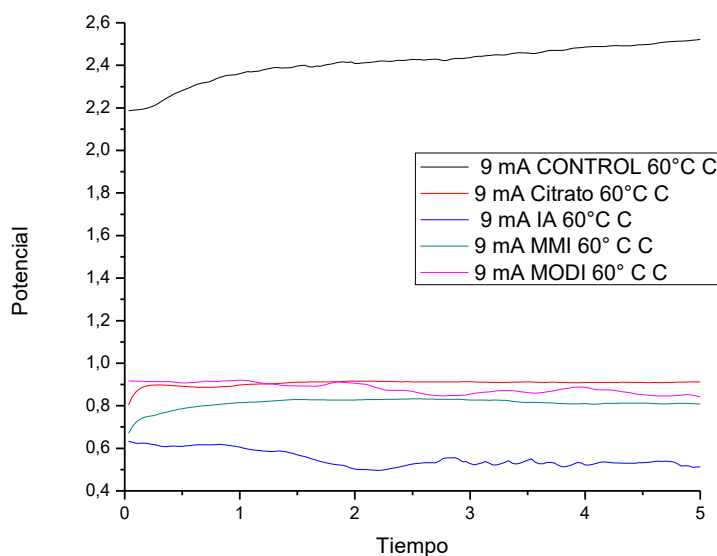


Fig 21. Gráfico de referencia del efecto de diferentes aditivos sobre la cristalización de CaOx al aplicar 9 mA en SC (C) a 60° C.

Los MWCNT funcionalizados con grupos ácidos son inhibidores más eficientes, en la concentración estudiada, que compuestos orgánicos de bajo peso molecular como el citrato. $MODI < MMI < IA$. El efecto de los CNT fue muy similar a ambas T°.

A medida que aumenta la temperatura en los EEQ aumenta el potencial alcanzado para cada una de las corrientes analizadas a 37 °C y 60 °C, y se observó que las curvas comienzan a estabilizarse de forma sostenida aumentando la temperatura y el efecto del sistema disminuye la variación entre cada punto obtenido en las CE. A pesar de ello no es posible inferir que esto tenga un efecto directo en la disposición y adhesión cristalina sobre los sustratos ITO.

3. Determinar la morfología, microanálisis elemental y polimorfismo de los cristales CaOx mediante microscopía óptica (MO) y electrónica de barrido (SEM), dispersión por energía dispersiva de rayos X (EDX) y difracción de rayos X (XRD), respectivamente.

MICROSCOPIA OPTICA (MO) Y ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM) SIN ADITIVO.

A continuación las imágenes obtenidas mediante MO y SEM en la obtención de un protocolo de cristalización de CaOx sin presencia de aditivo.

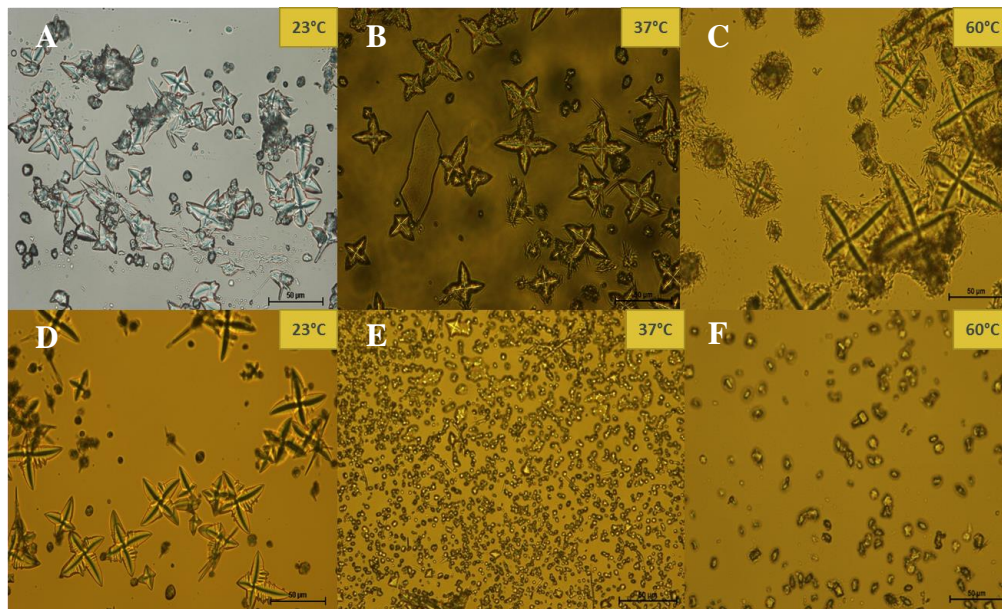


Fig 22. MO de CaOx a 1 mA, en SA (A,B,C) y SC (D,E,F), escala 50 µm y 100 µm.

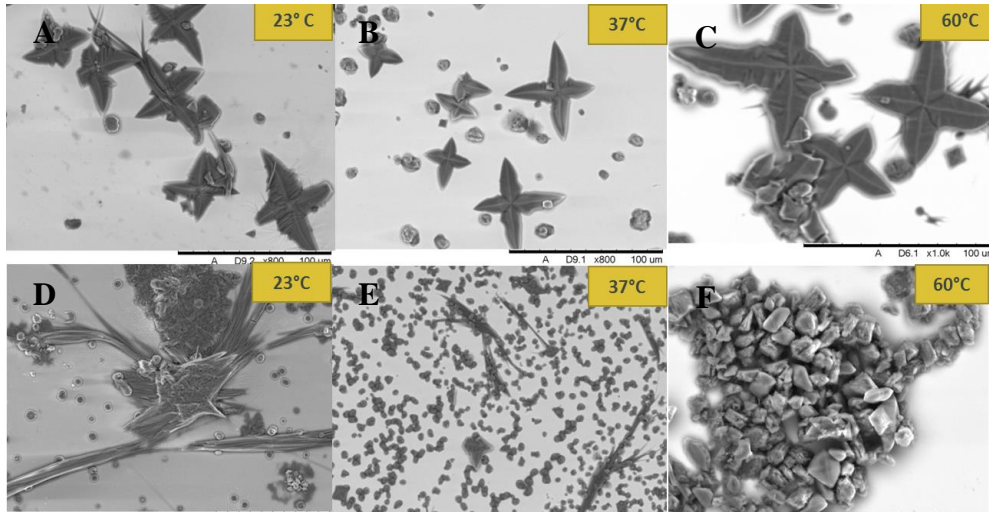


Fig 23. SEM de CaOx a 1 mA, en SA (A,B,C) y SC (D,E,F), escala 50 μm y 100 μm.

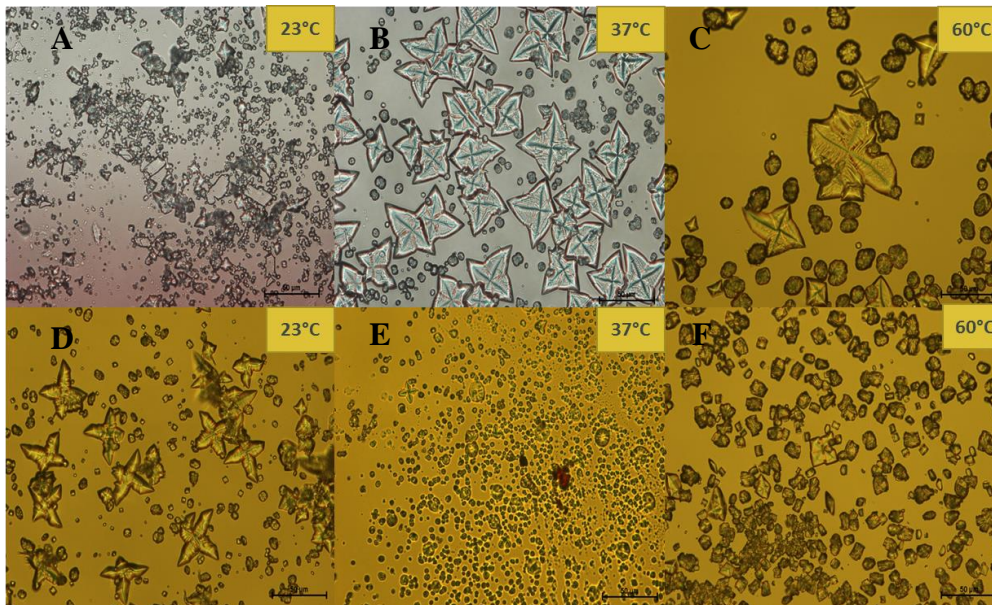


Fig 24. MO de CaOx a 3 mA, en SA (A,B,C) y SC (D,E,F), escala 50 μm y 100 μm.

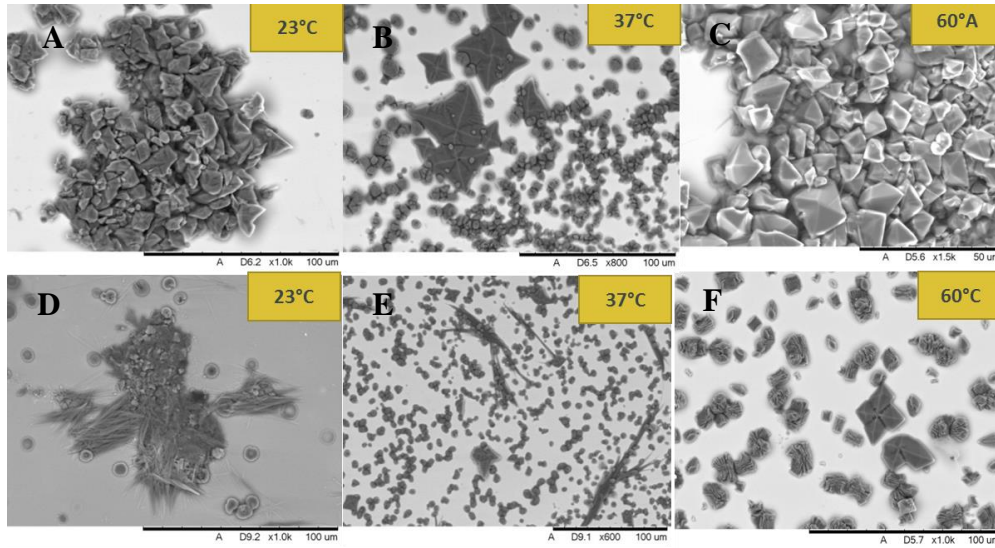


Fig 25. SEM de CaOx a 3 mA, en SA (A,B,C) y SC (D,E,F), escala 50 μ m y 100 μ m.

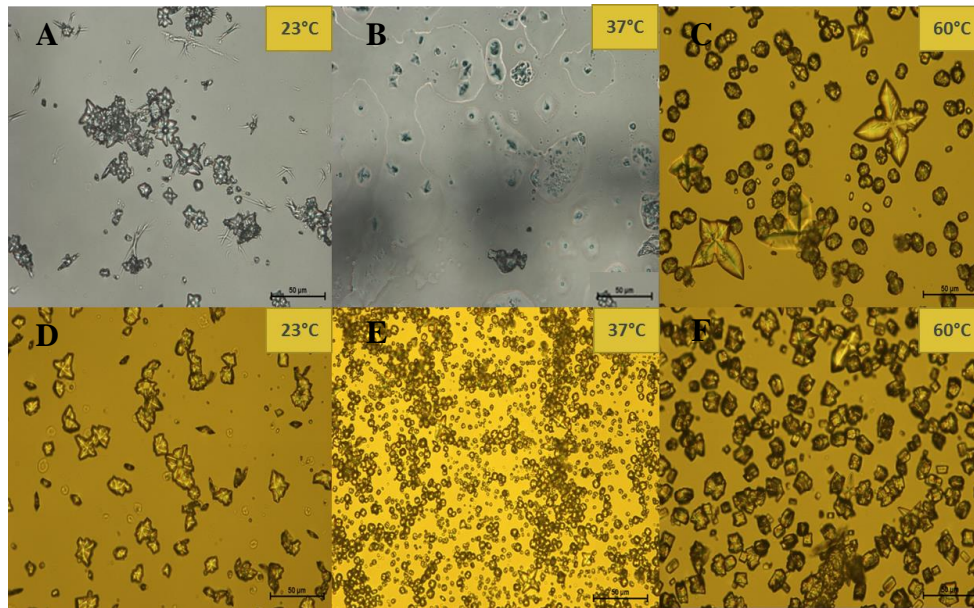


Fig 26. MO de CaOx a 6 mA, en SA (A,B,C) y SC (D,E,F), escala 50 μ m y 100 μ m.

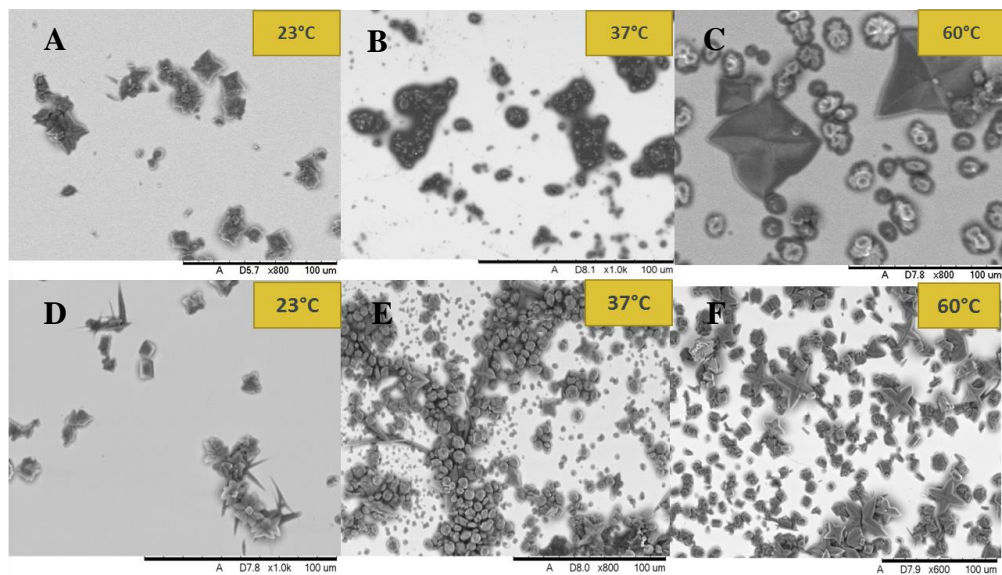


Fig 27. SEM de CaOx a 6 mA, en SA (A,B,C) y SC (D,E,F), escala 50 μm y 100 μm.

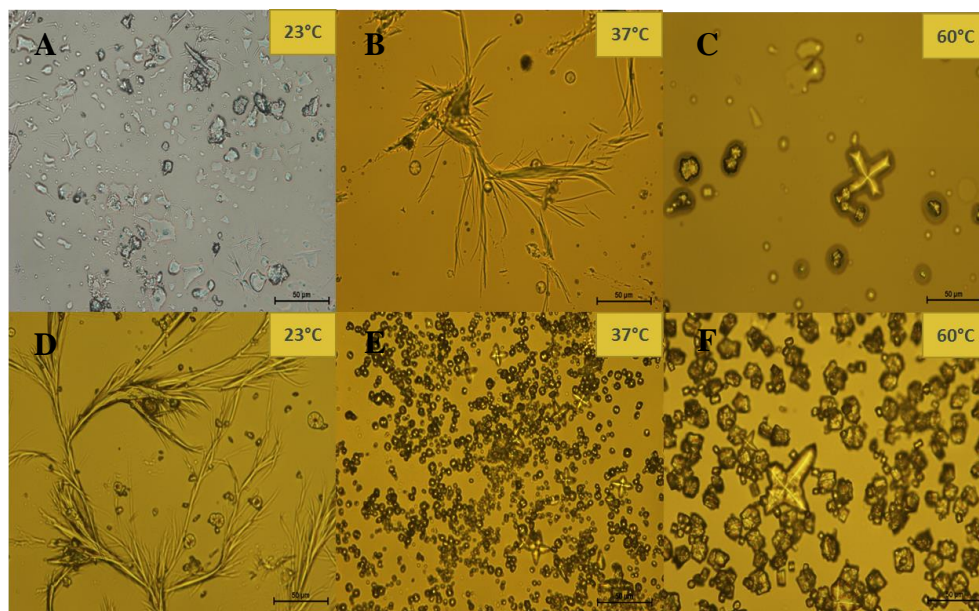


Fig 28. MO de CaOx a 9 mA, en SA (A,B,C) y SC (D,E,F), escala 50 μm y 100 μm.

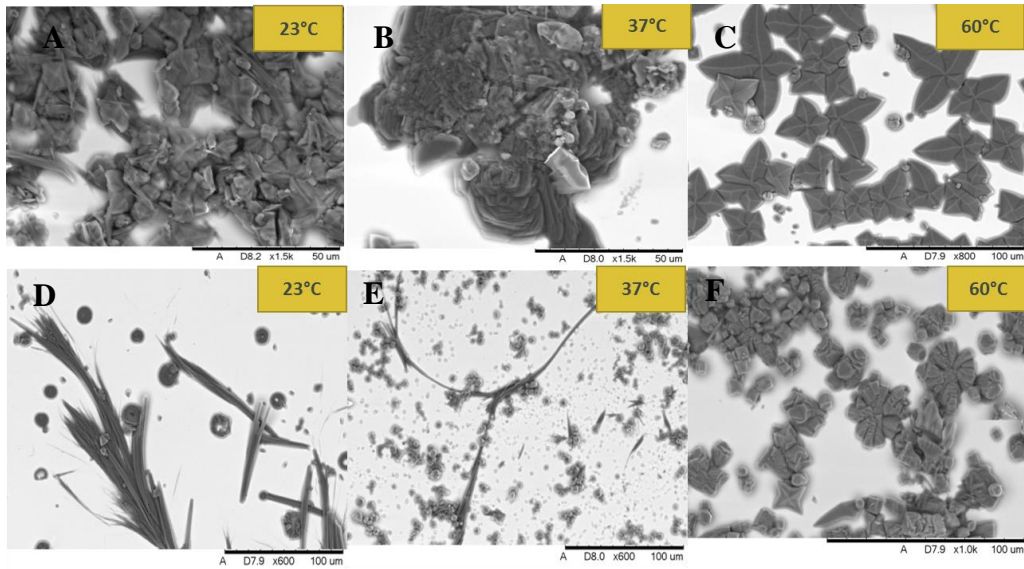


Fig 29. SEM de CaOx a 9 mA, en SA (A,B,C) y SC (D,E,F), escala 50 μm y 100 μm.

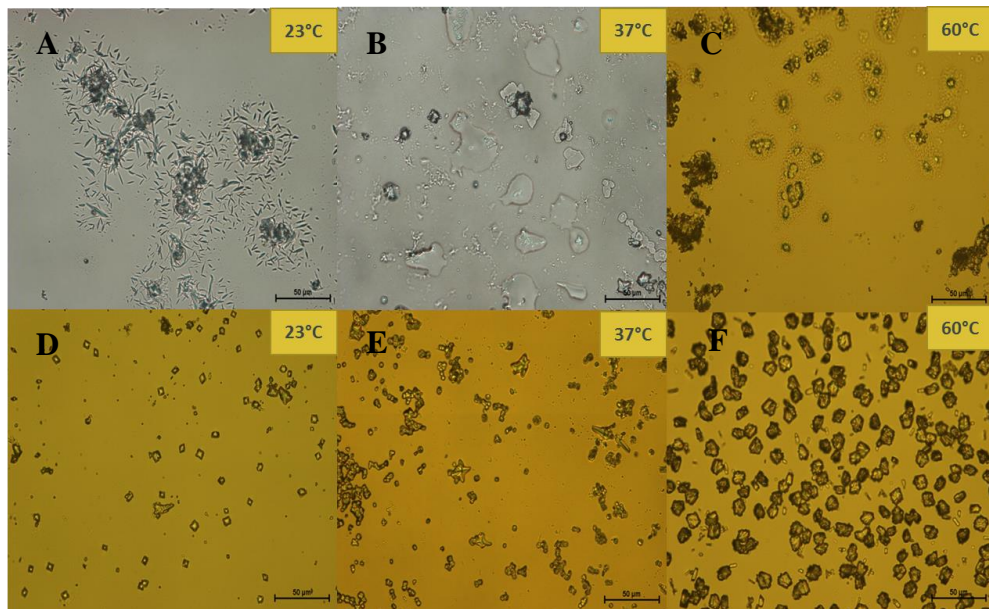


Fig 30. MO de CaOx a 12 mA, en SA (A,B,C) y SC (D,E,F), escala 50 μm y 100 μm.

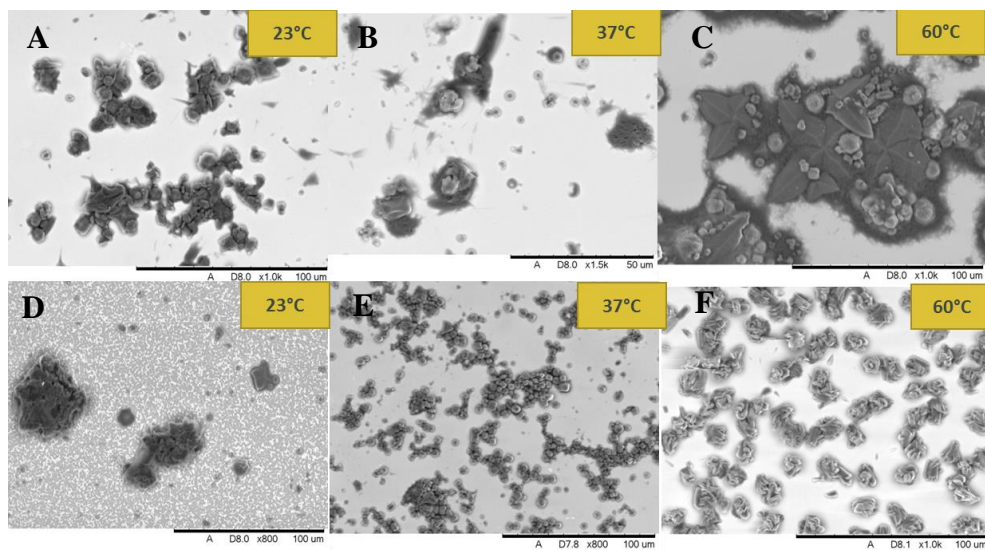


Fig 31. SEM de CaOx a 12 mA, en SA (A,B,C) y SC (D,E,F), escala 50 μm y 100 μm.

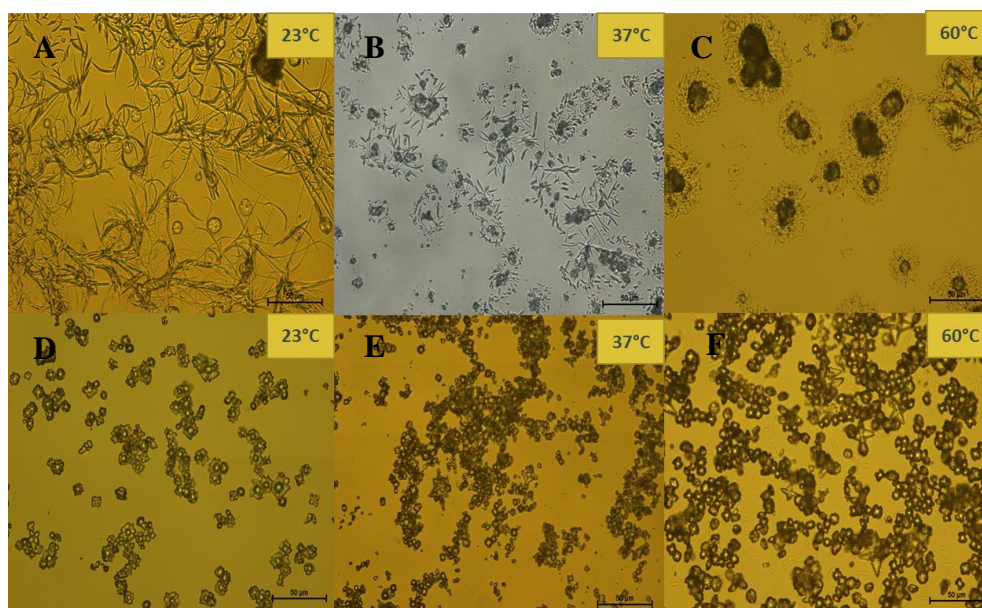


Fig 32. MO de CaOx a 15 mA, en SA (A,B,C) y SC (D,E,F), escala 50 μm y 100 μm.

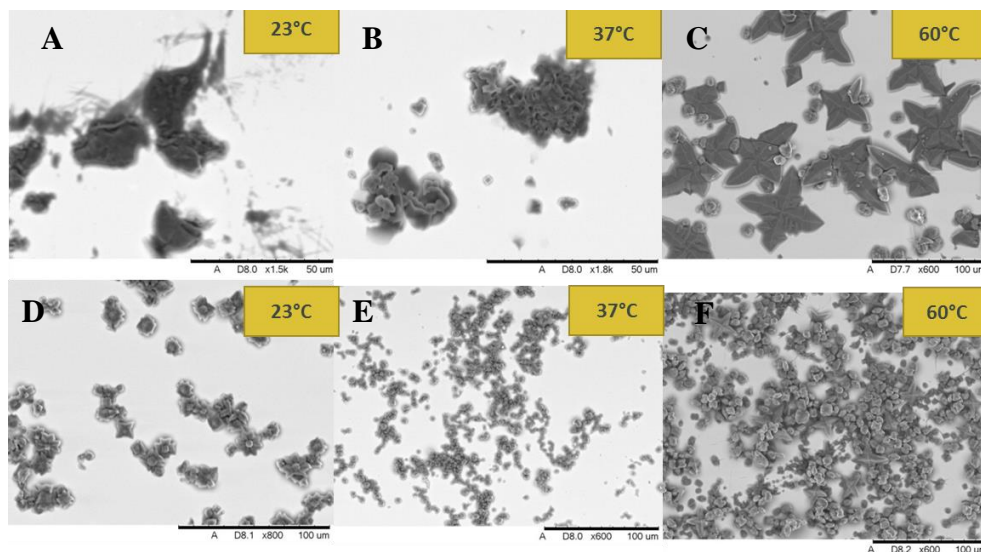


Fig 33. SEM de CaOx a 15 mA, en SA (A,B,C) y SC (D,E,F), escala 50 μm y 100 μm.

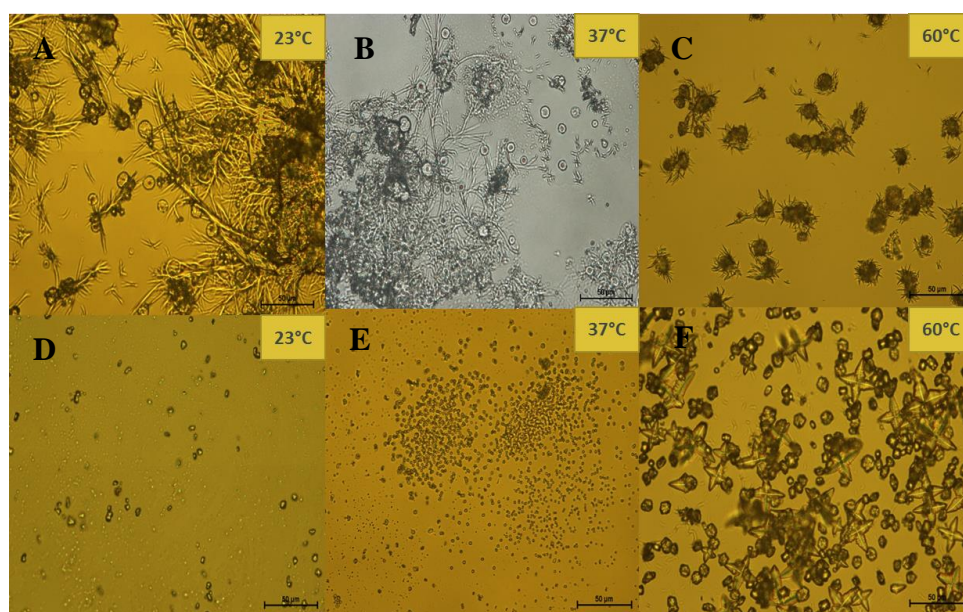


Fig 34. MO de CaOx a 18 mA, en SA (A,B,C) y SC (D,E,F), escala 50 μm y 100 μm.

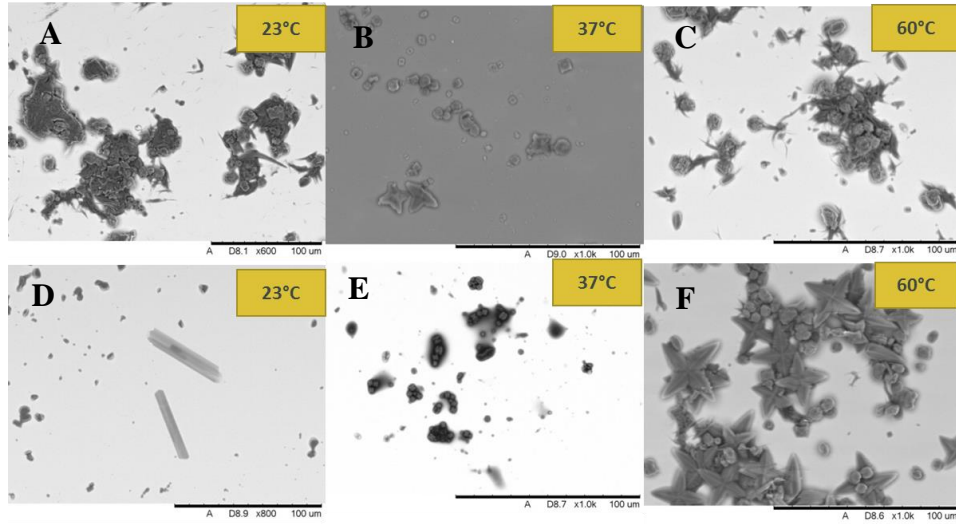


Fig 35. SEM de CaOx a 18 mA, en SA (A,B,C) y SC (D,E,F), escala 50 µm y 100 µm.

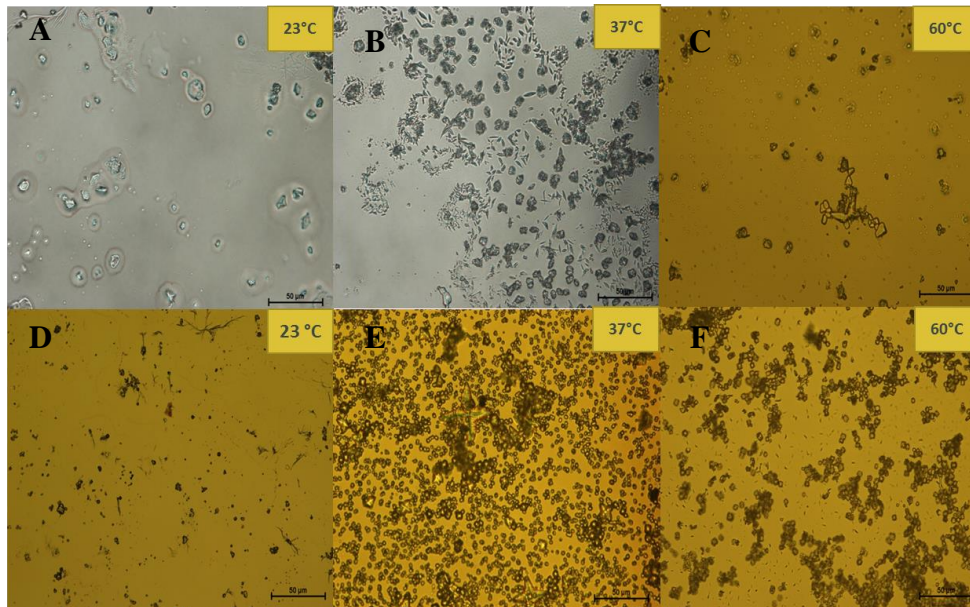


Fig 36. MO de CaOx a 21 mA, en SA (A,B,C) y SC (D,E,F), escala 50 µm y 100 µm.

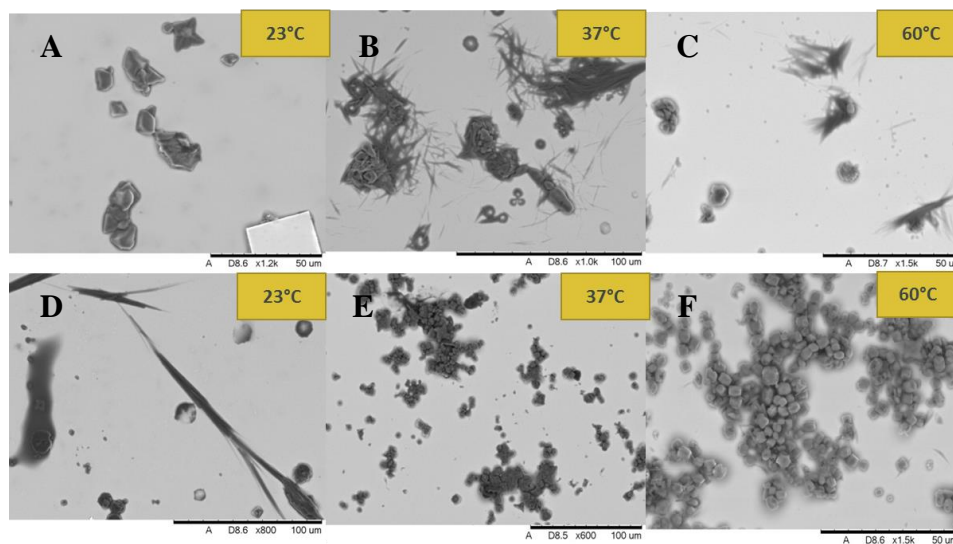


Fig 37. SEM de CaOx a 21 mA, en SA (A,B,C) y SC (D,E,F), escala 50 µm y 100 µm.

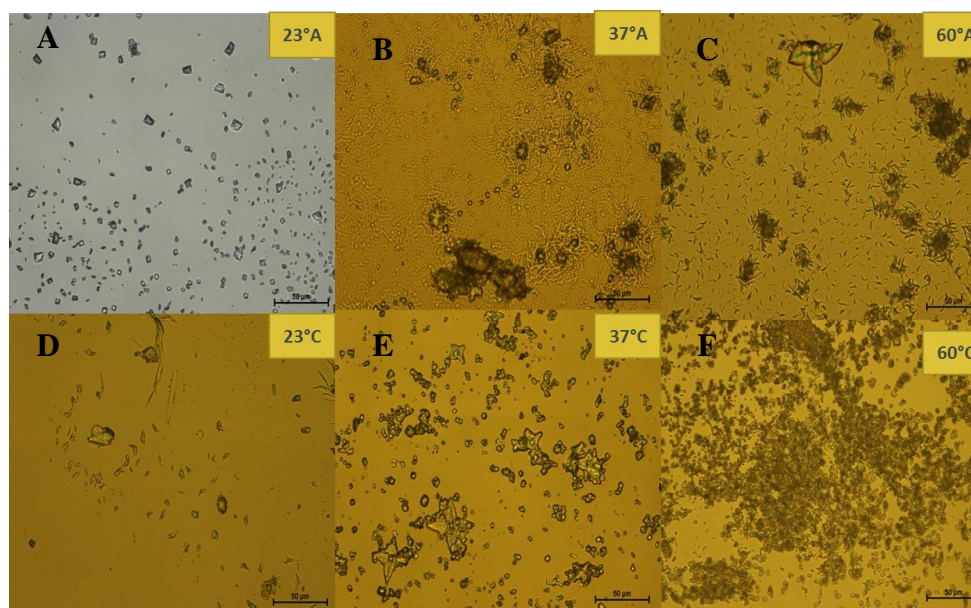


Fig 38. MO de CaOx a 24 mA, en SA (A,B,C) y SC (D,E,F), escala 50 µm y 100 µm.

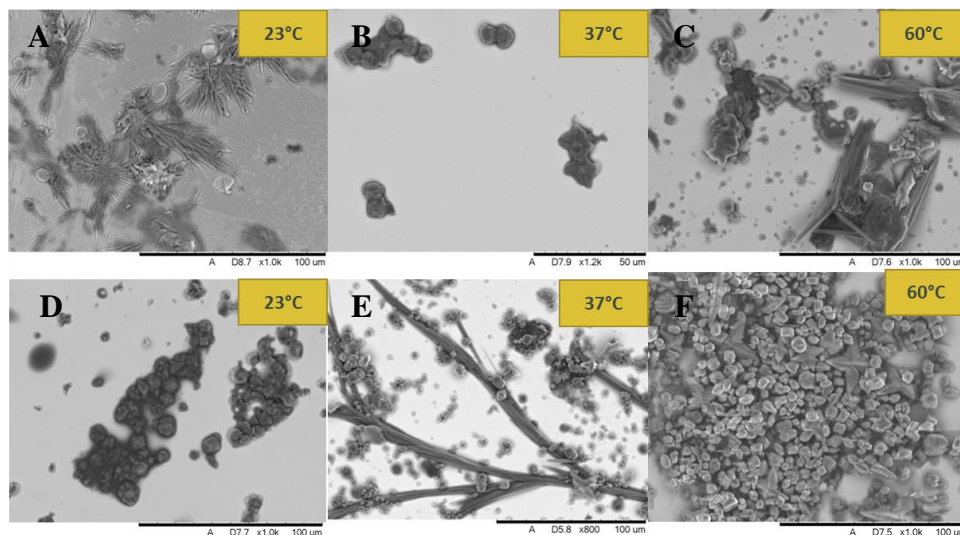


Fig 39. SEM de CaOx a 24 mA, en SA (A,B,C) y SC (D,E,F), escala 50 μm y 100 μm .

Se observaron variadas morfologías, las cuales fueron correspondieron a los tipos COD y COM. Se refleja este análisis en la tabla 5 cuyo objetivo es cuantificar las principales características encontradas según cada corriente aplicada en los dos sistemas electroquímicos SA y SC y la caracterización morfológica obtenida.

Tabla 5. Características de cristales CaOx analizados por microscopía óptica y SEM.

Sistema	Corriente (mA)	Temperatura (C°)	Principales Hallazgos
SC	1	37	Mayor cantidad de cristales.
SA		60	Cristales grandes (120 µm).
SC	3	37	Mayor cantidad de cristales.
SA		60	Cristales COD agregados.
SC	6	60	Cristales COM típico.
SA		60	Cristales grandes (100 µm).
SC	9	60	Cristales COM típicos agregados.
SA		60	Cristales grandes COD (60 µm).
SC	12	60	Cristales agregados.
SA		60	Cristales grandes (80 µm).
SC	15	60	Cristales agregados.
SA		60	Cristales grandes (60 µm).
SC	18	60	Cristales COD agregados.
SA		37	Cristales de estructura filamentosa.
SC	21	37	Cristales agregados.
SA		37	Cristales agregados.
SC	24	60	Numerosos cristales agregados.
SA		60	Cristales grandes forma indefinida.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) EN PRESENCIA DE CITRATO y MCWNT-IA, MCWNT-MMI Y MCWNT-MODI.

A continuación las imágenes obtenidas mediante MO y SEM en presencia de Citrato, y de MWCNT-IA, MWCNT-MMI y MWCNT-MODI.

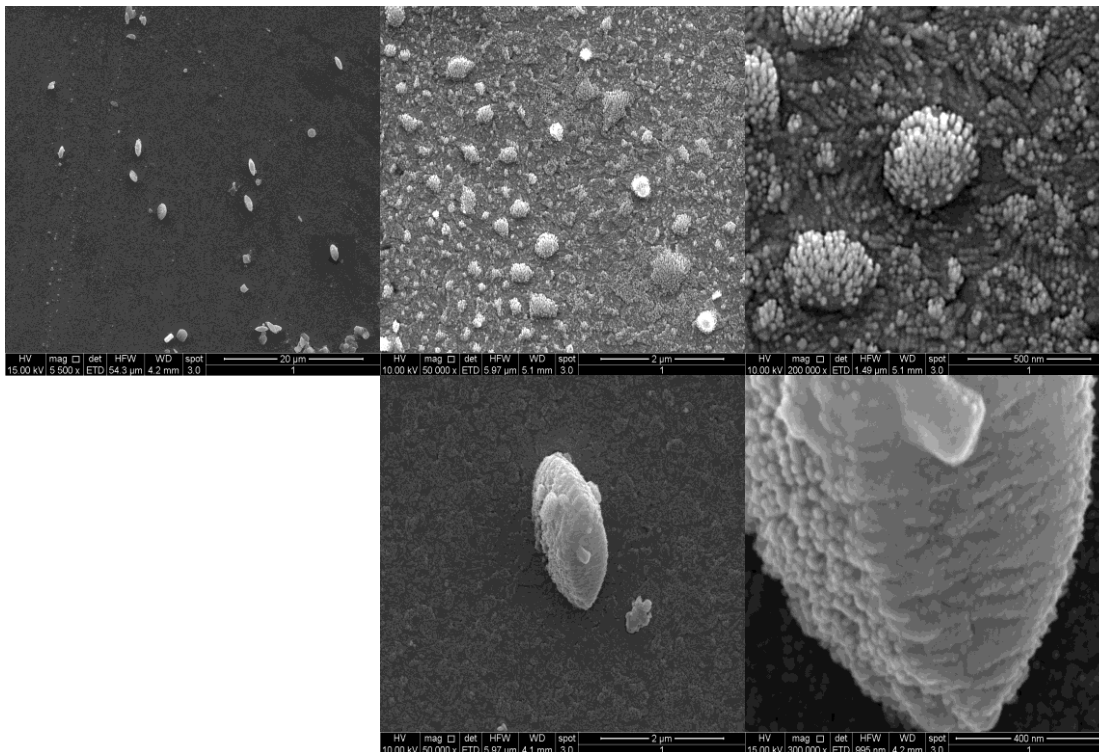


Fig 40. SEM de CaOx a 9 mA en SC a 37 °C en presencia de Citrato.

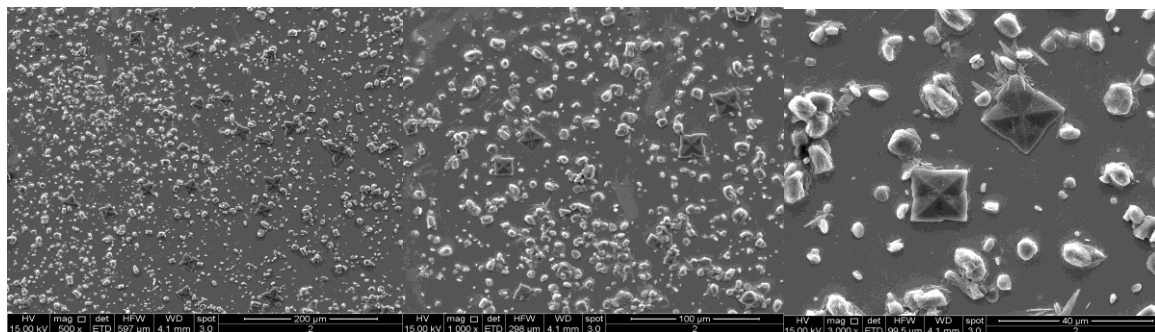


Fig 41. SEM de CaOx a 9 mA en SC a 60 °C en presencia de Citrato.

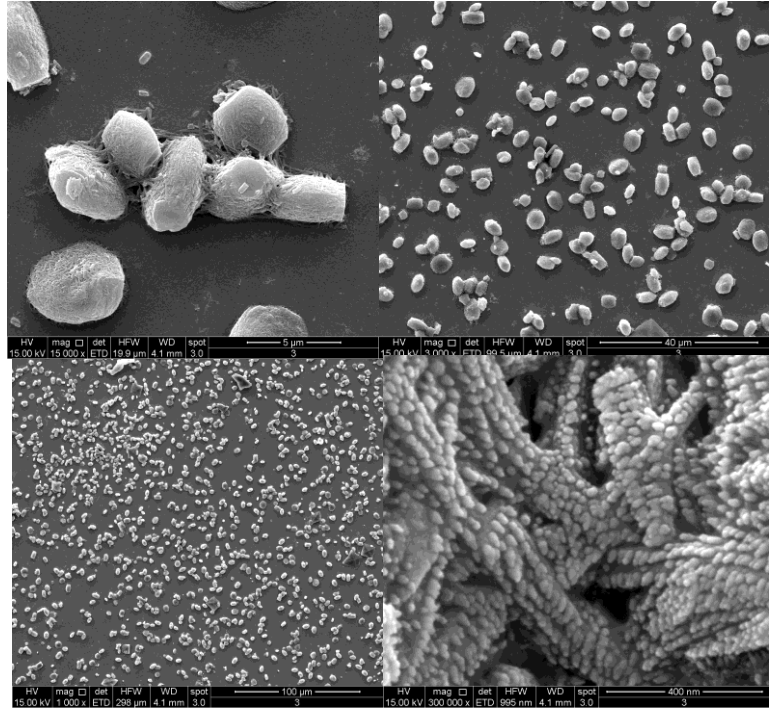


Fig 42. SEM de CaOx a 9 mA en SC a 37 °C en presencia de MWCNT-IA.

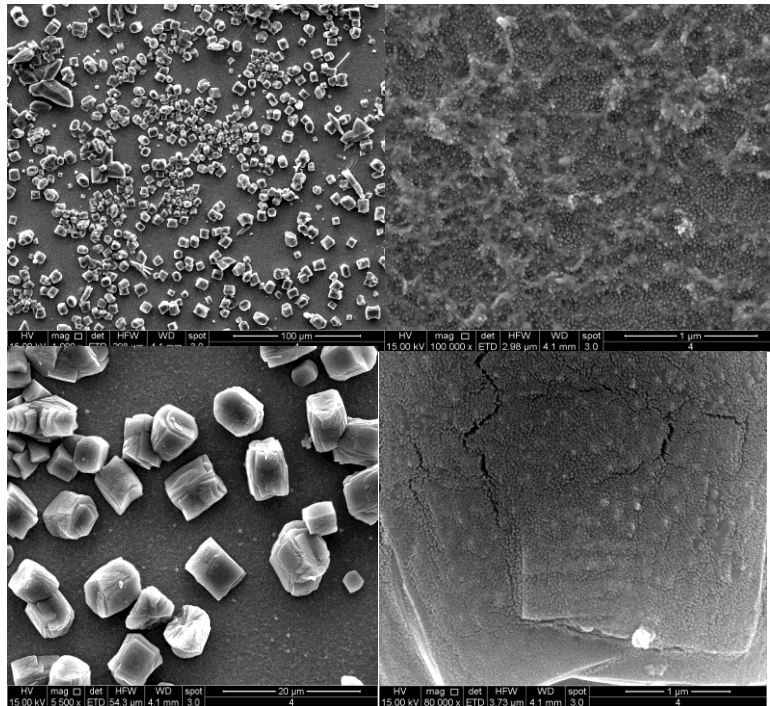


Fig 43. SEM de CaOx a 9 mA en SC a 60 °C en presencia de MWCNT-IA.

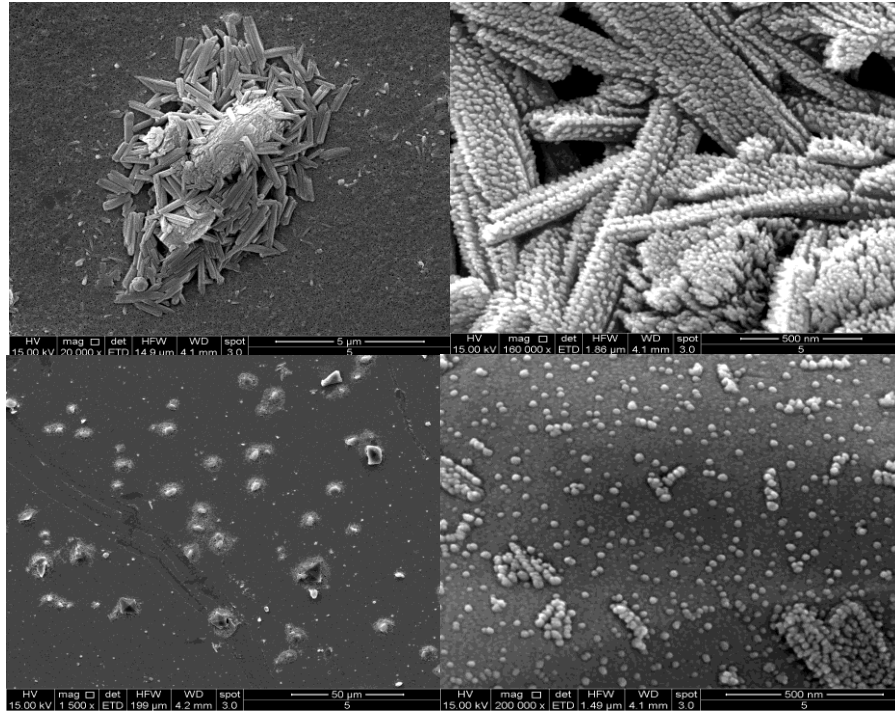


Fig 44. SEM de CaOx a 9 mA en SC a 37 °C en presencia de MWCNT-MMI.

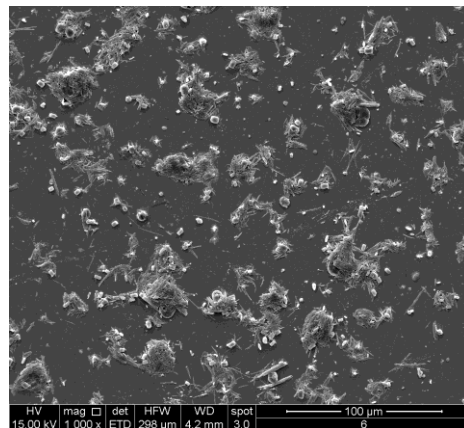


Fig 45. SEM de CaOx a 9 mA en SC a 60 °C en presencia de MWCNT-MMI.

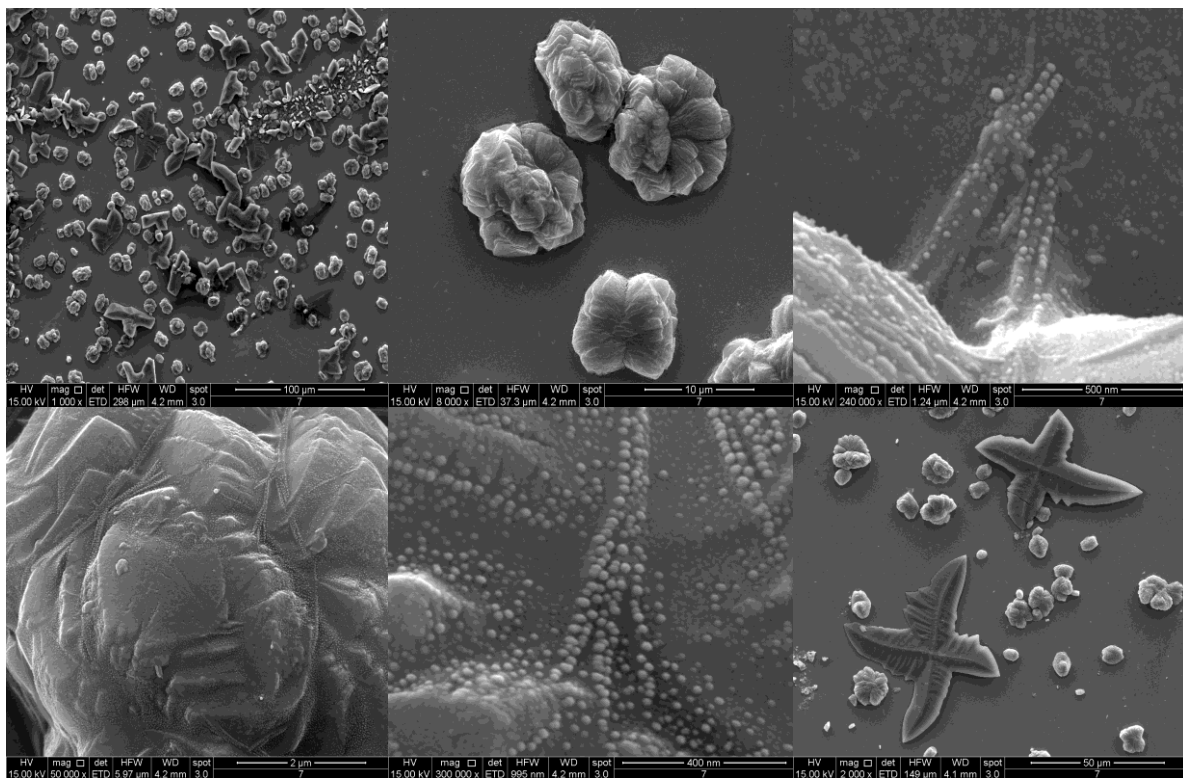


Fig 46. SEM de CaOx a 9 mA en SC a 37 °C en presencia de MWCNT-MODI.

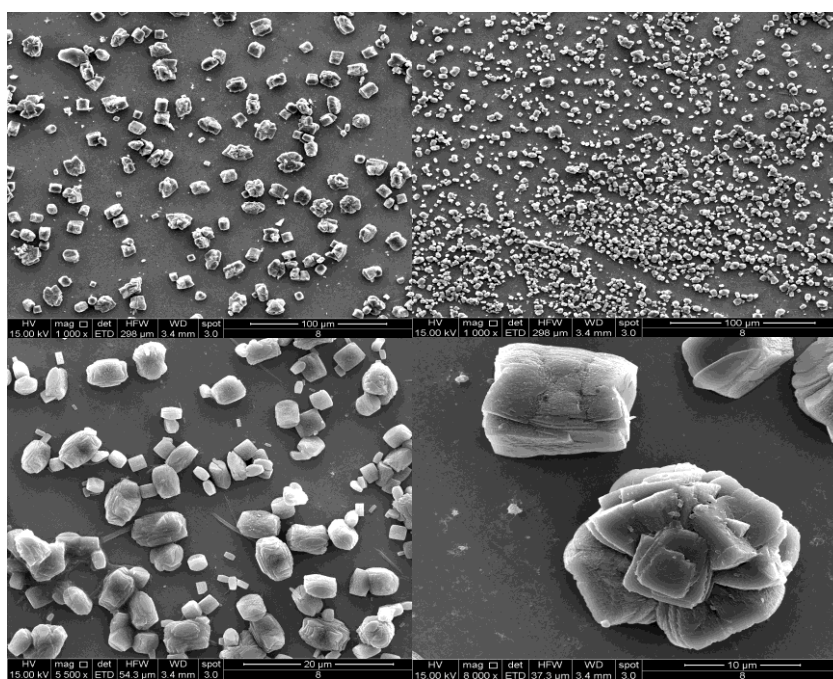


Fig 47. SEM de CaOx a 9 mA en SC a 60 °C en presencia de MWCNT-MODI.

Se observaron variadas morfologías, las cuales fueron agrupadas en: morfologías típicas de COD y COM. Se refleja este análisis en la tabla 6 cuyo objetivo es cuantificar las modificaciones que existieron en el cristal en presencia de los aditivos utilizados, Citrato, IA, MMI, MODI.

Tabla 6. Cristales CaOx en presencia de aditivos analizados por MO y SEM.

Aditivo	Corriente (mA)	Temperatura (C°)	Principales Hallazgos
Control	9	37	Cristales pequeños indiferenciados.
Control	9	60	Cristales pequeños COM (4 µm) en cantidad abundante.
Citrato	9	37	Cristales redondos indiferenciados en baja cantidad (4 µm), en baja cantidad.
Citrato	9	60	Abundantes cristales irregulares (4 µm) y presencia de COD (10 µm)
IA	9	37	Abundantes cristales redondos (5 µm) cuyas superficies son porosas.
IA	9	60	Abundantes cristales cuadrados (4 µm) y presencia de COD (7 µm)
MMI	9	37	Escasos cristales, se ven COD (5 µm) y pequeños trozos indiferenciados.
MMI	9	60	Aglomeración cristalina (40 µm) indiferenciada.
MODI	9	37	Cristales rugosos y presencia de COD (40 µm)
MODI	9	60	Abundantes Cristales cuadrados (4 µm) y tubulares (2 µm)

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO ACOPLADO A ENERGIA DISPERSIVA (SEM-EDS) SIN PRESENCIA DE ADITIVO.

A continuación se muestran las imágenes EDS obtenidas en el protocolo en búsqueda de los parámetros CaOx:

EDS obtenidas en SA escogidas en las siguientes figuras:

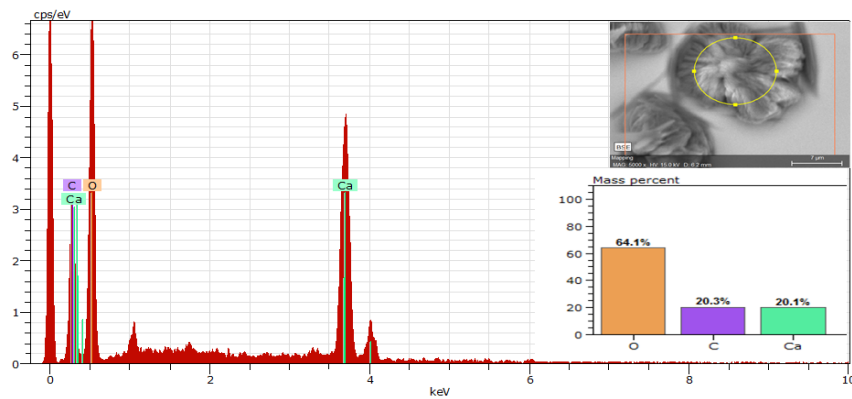


Fig 48. SEM/EDS de CaOx a 1 mA en SA a 23°C

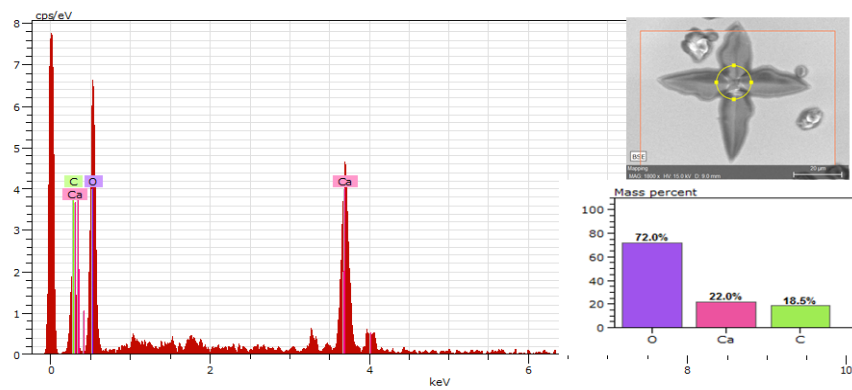


Fig 49. SEM/EDS de CaOx a 3mA en SA a 23°C.

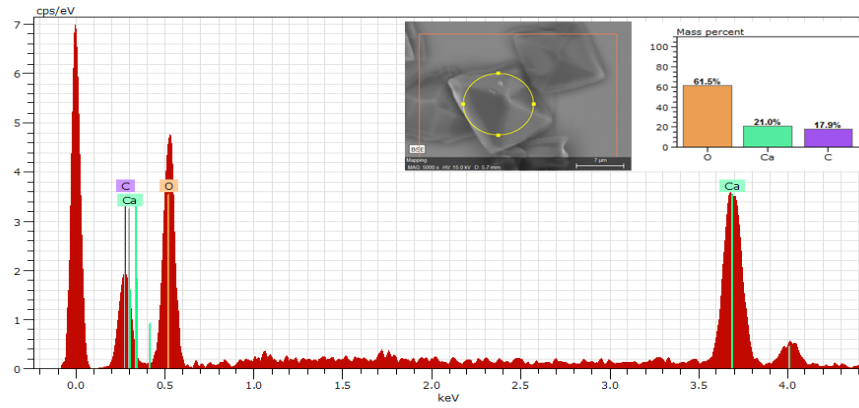


Fig 50. SEM/EDS de CaOx a 3mA en SA a 60°C. Se observa patrón morfológico COD típico.

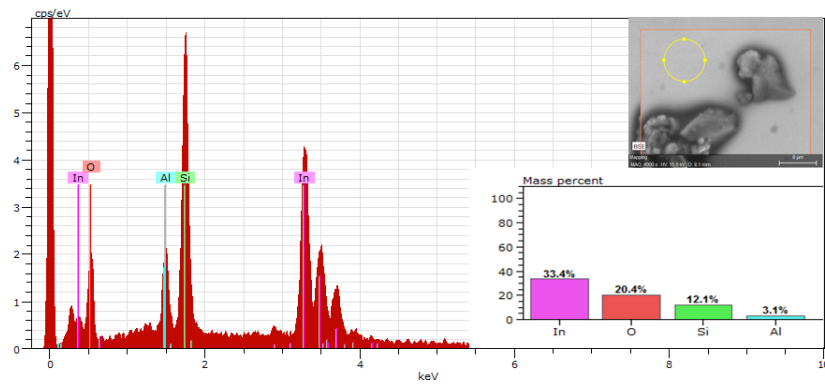


Fig 51. SEM/EDS de CaOx a 6mA en SA a 23°C. ITO (oxido de indio estaño).

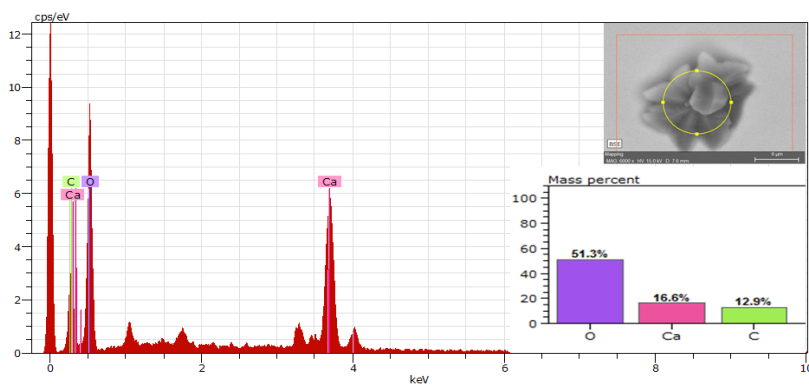


Fig 52. SEM/EDS de CaOx a 6mA SA a 23°C.

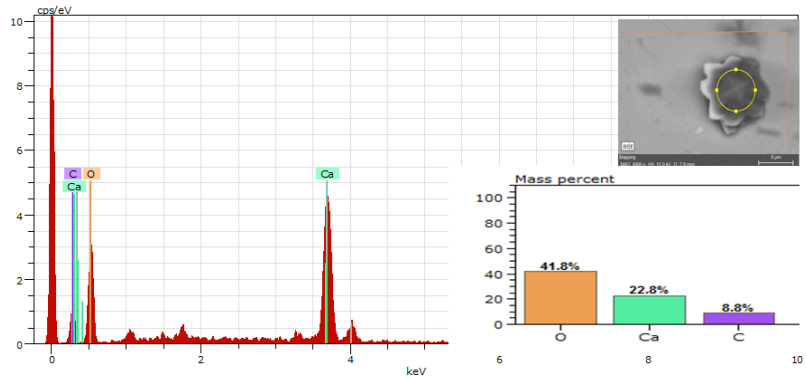


Fig 53. SEM/EDS de CaOx a 12 mA en SA a 23°C.

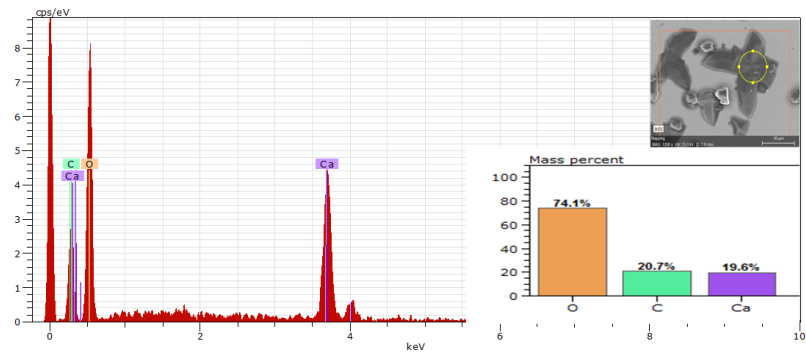


Fig 54. SEM/EDS de CaOx a 15 mA en SA a 37°C.

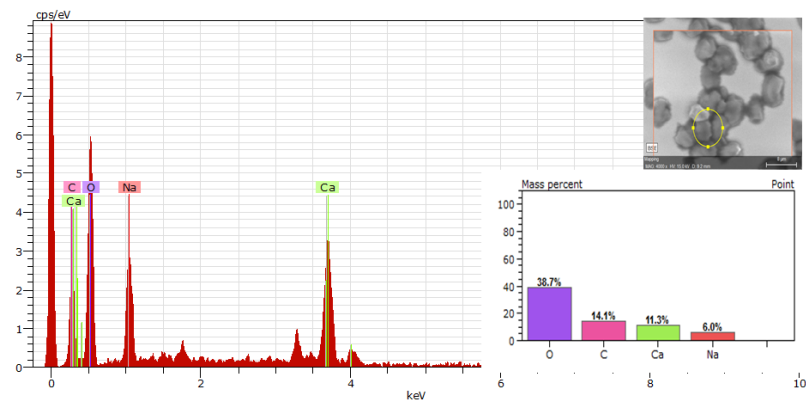


Fig 55. SEM/EDS de CaOx a 1 mA en SC a 37°C.

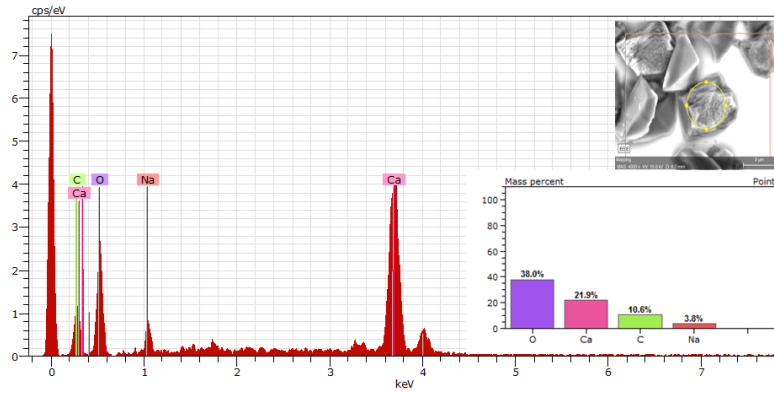


Fig 56. SEM/EDS de CaOx a 1 mA en SC a 37°C.

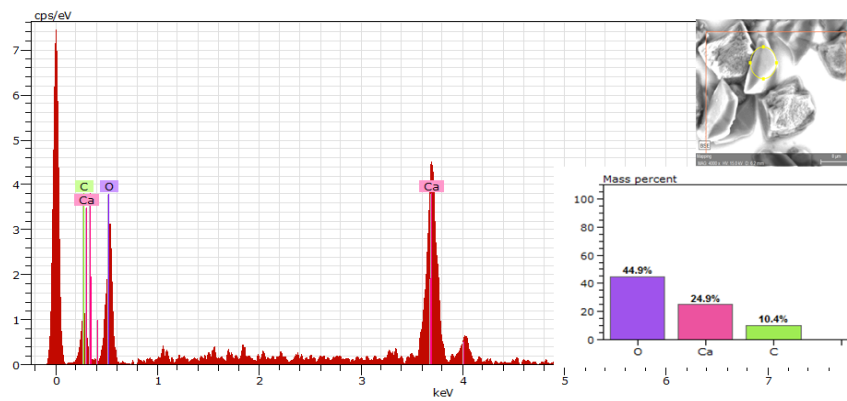


Fig 57. SEM/EDS de CaOx a 1 mA en SC a 37°C.

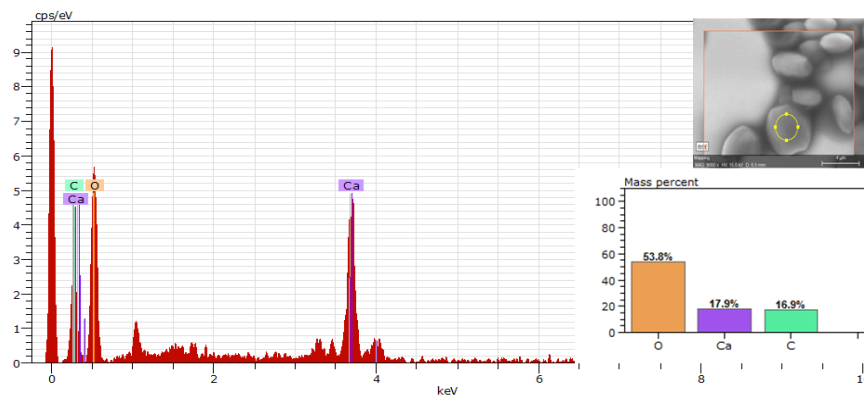


Fig 58. SEM/EDS de CaOx a 1 mA en SC a 37°C.

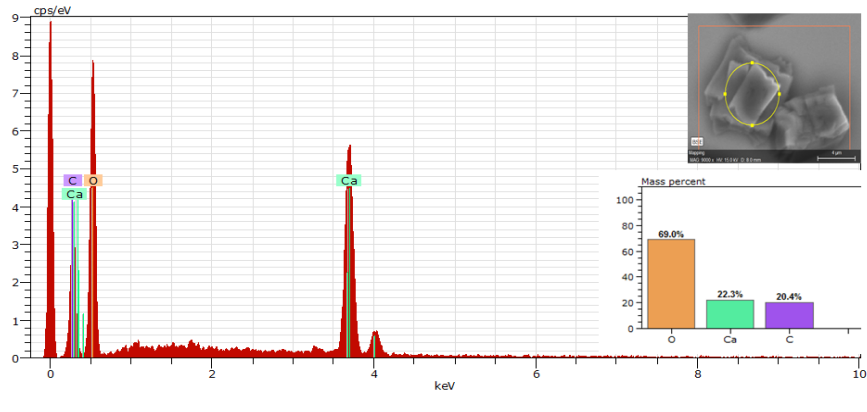


Fig 59. SEM/EDS de CaOx a 6 mA en SC a 60°C. Se observa patrón morfológico COM típico.

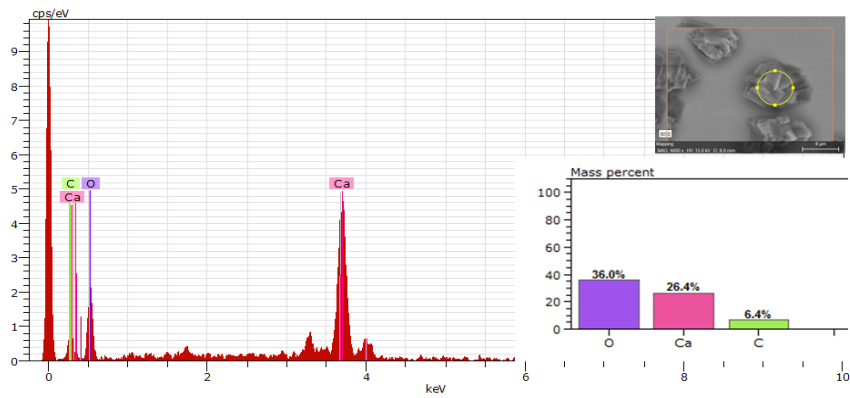


Fig 60. SEM/EDS de CaOx a 9 mA en SC 60°C. Se observa patrón morfológico COM típico.

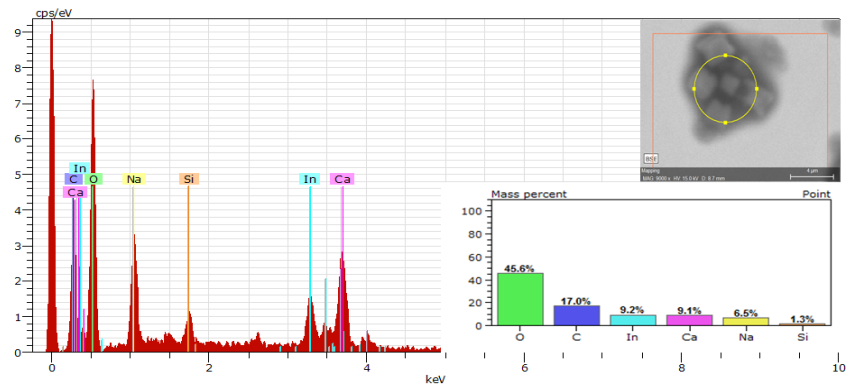


Fig 61. SEM/EDS de CaOx a 18 mA en SC 37°C.

La técnica EDS se utilizó en un total de 8 muestras (ver desde figura 40 a figura 53) y se distinguen ambas morfologías (COM y COD). Estas muestras se agruparon de acuerdo a las concentraciones típicas de los cristales CaOx que corresponden a una razón 1:3:1 de C: O: Ca, (siendo C: carbono, O: oxígeno y Ca: Calcio) como podemos ver en la siguiente tabla.

Tabla 7. Análisis por tipo de sistema electroquímico, elemento químico razón y peso según condiciones electroquímicas experimentales.

SA				SC			
Muestra	Elemento	Peso total %	Razón Ca:O:C	Muestra	Elemento	Peso total %	Razón Ca:O:C
1mA 60°C	Ca	19,25	0,96	1mA 60°C	Ca	29,53 ²	1,47
	C	19,44	0,97		C	14,28 ²	0,71
	O	61,31	3,06		O	51,12 ²	2,56
6 mA 23°C	Ca	20,52	1,02	6 mA 60°C	Ca	19,95	0,96
	C	16	0,8		C	18,27	0,91
	O	63,49	3,17		O	61,78	3,08
9 mA 37°C	Ca	10,52 ¹	0,52	9 mA 60°C	Ca	38,32	1,91
	C	21,52 ¹	1,07		C	9,33	0,46
	O	50,38 ¹	2,51		O	52,35	2,61
12 mA 60°C	Ca	20,14	1,07	18 mA 37°C	Ca	10,25 ³	0,51
	C	16,36	0,81		C	19,18 ³	0,96
	O	63,5	3,17		O	51,41 ³	2,57

¹ En estas muestras se midió átomos de estaño, indio y silicio (WT) (valores no informados), por lo cual la sumatoria de los pesos totales (%) no es 100%.

² En estas muestras se midió átomos de sodio (valores no informados), por lo cual la sumatoria de los pesos totales (%) no es 100%.

³ En estas muestras se midió átomos de sodio, estaño, indio y silicio (valores no informados), por lo cual la sumatoria de los pesos totales (%) no es 100%.

DIFRACCIÓN DE RAYOS X (XRD)

La difracción de rayos X (XRD) es una técnica más apropiada que la microscopía electrónica de barrido (SEM) para identificar los diferentes constituyentes inorgánicos presentes en los cálculos renales, ya que los distintos componentes presentan patrones de difracción únicos; lo que permite la identificación precisa de sustancias cristalinas desconocidas. En este estudio de electrocristalización, XRD fue utilizada para confirmar las morfologías representativas visualizadas por SEM. (Neira-Carrillo *et al*, 2015)

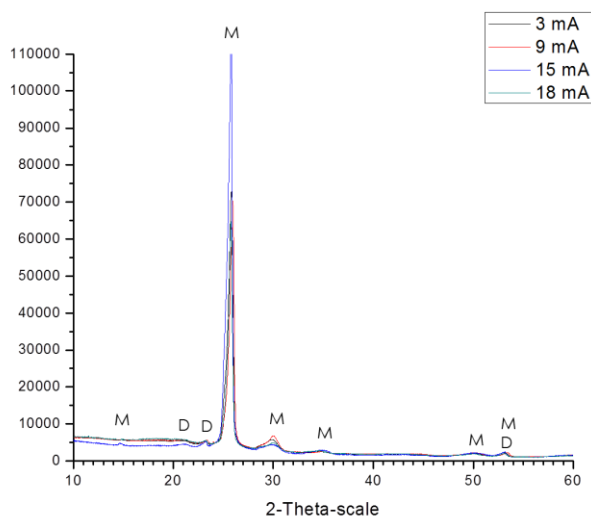


Fig 62. XRD de cristales CaOx crecidos sobre sustratos ITO a 3, 9, 15, y 18 mA.

Los picos de difracción característicos de los cristales COM y COD fueron marcados con las letras “M” and “D”, respectivamente.

En la Figura 62 se muestran los patrones XRD de las muestras de cristales CaOx electrodepositados a 3, 9, 15 y 18 mA. Se muestra patrones XRD con picos de difracción alrededor de $2\theta = 15^\circ$, 23.2° , 24.2° , 25.8° , 30° , 35° , 50° y 53° , confirmando la presencia de cristales COM y COD. La aplicación de potenciales diferentes no se traduce en patrones de difracción XRD distintos.

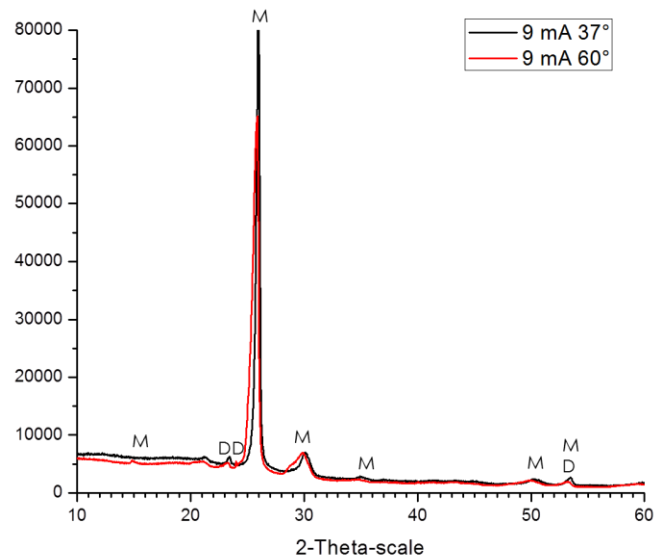


Fig 63. XRD de cristales CaOx crecidos sobre sustratos ITO 9 mA , a 37°C y 60°C. Los picos de difracción característicos de los cristales COM y COD fueron marcados con las letras “M” and “D”, respectivamente.

En la figura 63, los picos de difracción XRD observados fueron semejantes a los descritos en la figura 50. De esta forma es posible concluir que a 37°C y 60°C, en ausencia de aditivo, no existen diferencias en el espectro cristalino.

Las figuras 64 hasta la figura 67 muestran los difractogramas de las electrocristalizaciones realizadas en presencia de: citrato (control positivo), y los aditivos IA, MMI y MODI, respectivamente.

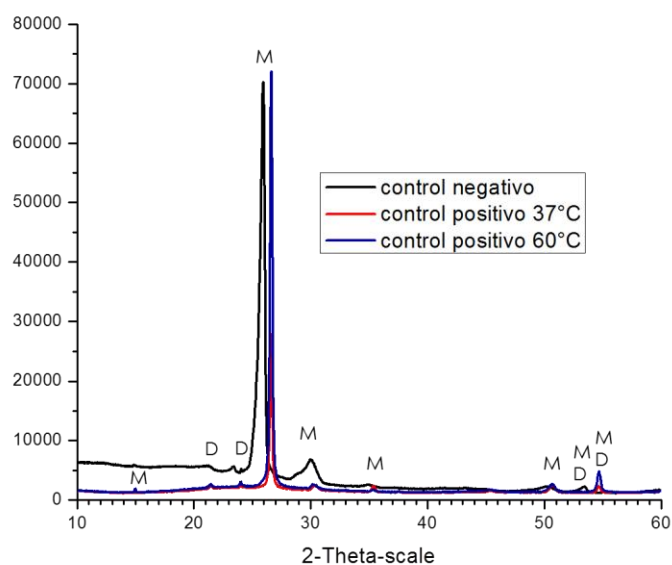


Fig 64. XRD de cristales CaOx crecidos sobre sustratos ITO en presencia de citrato (control positivo) a 9 mA, a 37°C y 60°C. Los picos de difracción característicos de los cristales COM y COD fueron marcados con las letras “M” and “D”, respectivamente

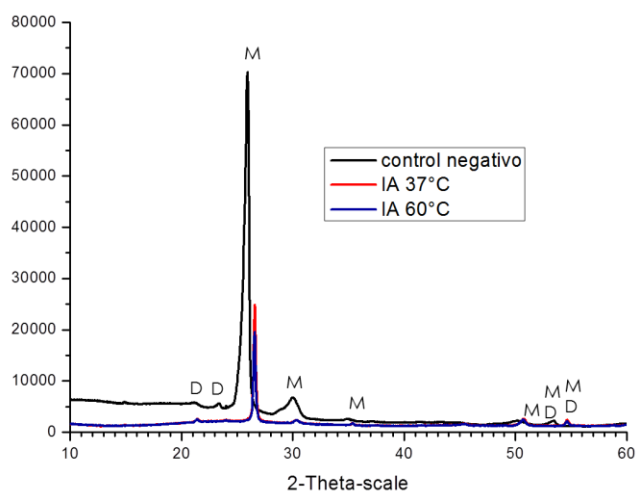


Fig 65. XRD de cristales CaOx crecidos sobre sustratos ITO en presencia de IA a 9 mA, a 37°C y 60°C. Los picos de difracción característicos de los cristales COM y COD fueron marcados con las letras “M” and “D”, respectivamente.

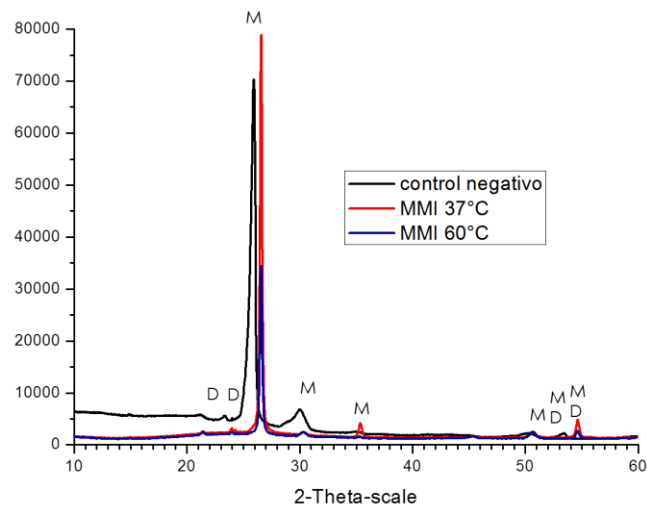


Fig 66. XRD de cristales CaOx crecidos sobre sustratos ITO en presencia de MMI a 9 mA, a 37°C y 60°C. Los picos de difracción característicos de los cristales de COM y COD fueron marcados con las letras “M” and “D”, respectivamente.

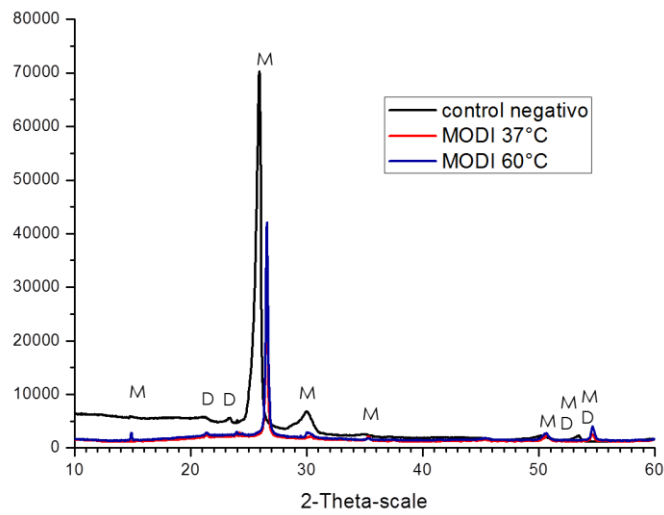


Fig. 67. XRD de cristales CaOx crecidos sobre sustratos ITO en presencia de MODI 9 mA, a 37°C y 60°C. Los picos de difracción característicos de los cristales de COM y COD fueron marcados con las letras “M” and “D”, respectivamente.

Tabla 8. Difractogramas correspondientes al control positivo (citrato), IA, MMI y MODI.

		Difractograma		XRD	Control	positivo	
Grados (control)	Intesidad 2 θ (control)	Grados Control Positivo	Intensidad 2 θ	Intensidad 2 θ	Intensidad 2 θ	Dif. Control	Dif. Control
15°	5857	15°	37°C	1922	60°C	37°C	60°C
23,2°	5566	23,2°	37°C	2644	60°C	-3935	-4659
24,2°	5568	24,2°	37°C	3049	60°C	-2922	-3198
25,8°	70319	26,2°	37°C	72119	60°C	-2519	-3375
30°	6656	30,3°	37°C	2548	60°C	1800	-43037
35°	2497	35°	37°C	1611	60°C	-4108	-4196
50°	2233	50°	37°C	2720	60°C	-886	-90
53°	2276	54,8	37°C	4608	60°C	487	424
			37°C	2330	60°C	2332	54
		Difractograma		XRD	IA		
Grados (control)	Intesidad 2 θ (control)	Grados IA	Intensidad 2 θ	Intensidad 2 θ	Intensidad 2 θ	Dif. Control	Dif. Control
15°	5857	15°	37°C	•	60°C	37°C	60°C
23,2°	5566	23,2°	37°C	2497	60°C	X	X
24,2°	5568	24,2°	37°C	2179	60°C	X	X
25,8°	70319	26,2°	37°C	19256	60°C	-3069	-2955
30°	6656	30,3°	37°C	2358	60°C	-3389	-3136
35°	2497	35°	37°C	1667	60°C	-51063	-45768
50°	2233	50°	37°C	2108	60°C	-4298	-4485
53°	2276	54,8	37°C	2087	60°C	-830	-1034
			37°C	2408	60°C	-125	408
			37°C	2408	60°C	-189	132
		Difractograma		XRD	MMI		
Grados (control)	Intesidad 2 θ (control)	Grados MMI	Intensidad 2 θ	Intensidad 2 θ	Intensidad 2 θ	Dif. Control	Dif. Control
15°	5857	15°	37°C	•	60°C	37°C	60°C
23,2°	5566	23,2°	37°C	2528	60°C	•	•
24,2°	5568	24,2°	37°C	3201	60°C	•	•
25,8°	70319	26,2°	37°C	78872	60°C	-3038	-3116
30°	6656	30,3°	37°C	2444	60°C	-2367	-3202
35°	2497	35°	37°C	3995	60°C	8553	-35889
50°	2233	50°	37°C	2418	60°C	-4212	-4213
53°	2276	54,8	37°C	3993	60°C	1498	-921
			37°C	2604	60°C	185	264
			37°C	2604	60°C	1717	328
		Difractograma		XRD	MODI		
Grados (control)	Intesidad 2 θ (control)	Grados MODI	Intensidad 2 θ	Intensidad 2 θ	Intensidad 2 θ	Dif. Control	Dif. Control
15°	5857	15°	37°C	1330	60°C	37°C	60°C
23,2°	5566	23,2°	37°C	2416	60°C	-4527	-3017
24,2°	5568	24,2°	37°C	2465	60°C	-3150	-2728
25,8°	70319	26,2°	37°C	32620	60°C	-3103	-3126
30°	6656	30,3°	37°C	2031	60°C	-37699	-28206
35°	2497	35°	37°C	2007	60°C	-4625	-3820
50°	2233	50°	37°C	2354	60°C	-490	-839
53°	2276	54,8	37°C	2470	60°C	121	409
			37°C	2470	60°C	194	1714

La tabla 8 muestra las diferencias en los difractogramas de las muestras controles y aquellas muestras obtenidas utilizando aditivos IA, MMI y MODI. Se muestran las intensidades de los picos cristalográficos, y las diferencias entre los grados de obtenidos, las cuales fueron mínimas. El pico de difracción ubicado en 15° plano (200) correspondiente a COM desapareció frente IA y MMI. Existe mayor variación en la intensidad del pico obtenido a $25,8^\circ$ plano (222) de cristales COM en muestras obtenidas en presencia de citrato y MMI a ambas temperaturas. Además, se indica con signo negativo (-) aquellas muestras en las cuales el pico de difracción fue menor respecto al control. Finalmente, se puede señalar que los aditivos utilizados modulan la intensidad cristalina. (Neira-Carrillo *et al*, 2015)

DISCUSIÓN

En esta investigación se logró a través de una celda electroquímica demostrar un control en la inducción del polimorfismos del CaOx, induciendo COM y COD utilizando distintas concentraciones de reactantes (30, 45, 75 mM) y en diferentes corrientes eléctricas (3, 9, 12, 18, 24 mA) y de esta manera estudiar el crecimiento y la nucleación cristalina (Neira-Carillo *et al.*, 2015).

Estudios anteriores han reportado la formación de cristales CaOx a través de la técnica de óxido reducción como podemos leer en el handbook de Aliofkhazraei y Hamdy (2016). Por otro lado, se ha desarrollado la electrogeneración de sales de calcio, e.g. carbonato de calcio (CaCO₃) (Euvrard *et al.*, 2000).

El sustrato ITO es un material muy útil para el desarrollo de numerosas aplicaciones, tanto en el área óptica como electrónica (Anipa *et al.*, 2015). En el caso de la electrocristalización de CaCO₃, los electrodos WE que se han utilizado en estudios previos y realizados por otros grupos de investigación, ejemplos: compuestos de carbono o cubiertos por óxido, semejantes a los sustratos ITO. Los depósitos inorgánicos formados sobre los WE no fueron conductores, reduciendo el área activa del electrodo, y por ende constituyendo una barrera para la difusión de oxígeno. Posteriormente, la conductividad catódica disminuye, lo que es posible visualizar en mediciones cronoamperométricas (Ketrane *et al.*, 2009). El registro de la corriente eléctrica en los ensayos puede ser analizado según el tiempo, siendo posible cuantificar en qué momento el sustrato ITO es cubierto por cristales. La técnica electroquímica es apropiada, siendo relativamente simple para la formación de depósitos inorgánicos de micro y nano estructuras (Aoki *et al.*, 2009).

Joseph y Kamath (2010) lograron depositar cristales CaOx al estabilizar el pH entre 9 - 11 sobre sustratos ITO a 23°C y 65°C, y densidades de voltaje de 3 mA y 6 mA. Estos autores hipotetizaron que los cristales CaOx, al inicio de la reacción de electrocristalización correspondían a oxalato de calcio dihidratado (COD), los que posteriormente se transformarían en monohidratado (COM).

Anteriormente en nuestro laboratorio se encontró el mejor ambiente para la realización de ensayos con distintos polímeros. En el desarrollo de esta tesis se tomaron decisiones

respecto a la formulación del protocolo de trabajo. Entre ellas, se destaca utilizar la temperatura ambiente como parte del protocolo y no saturar la celda con oxígeno como anteriormente se realizó. Confirmamos que la formación de cristales CaOx de esta forma era reproducible, aunque la saturación con oxígeno es utilizada frecuentemente en voltimetría cíclica propia de carbonato de calcio.

Se amplió el rango de corrientes eléctricas a evaluar (desde 1 a 24 mA), seleccionando como condición óptima aquella en que se logró electrodepositar una cantidad cristales CaOx, de morfología homogénea, reproducibilidad, etc. La corriente elegida fue 9 mA.

Posteriormente, de las tres temperaturas planteadas para los ensayos de electrocristalización de CaOx, se decidió utilizar 37°C y 60°C, ya que los cristales CaOx obtenidos a 23°C no fueron reproducibles. Se plantea realizar en estudios futuros, ensayos de cristalización a temperaturas inferiores a 23°C, en búsqueda de estructuras amorfas

Según los cristales obtenidos en un inicio en ausencia de aditivos se compararon las relaciones entre sus componentes elementales, como sus pesos atómicos totales además de sus morfologías en estudios clínicos, para contrastar si es posible validar este protocolo para la obtención de CaOx.

Didenko *et al.* 2014 estudiaron la composición elemental de zonas distintas de una concreción renal encontrada en un individuo mediante SEM/EDS. Superficie lisa (A), superficie afilada (B) y superficie porosa (C).

Tabla 9. Composición elemental de la concreción renal.

Superficie	Elemento	Peso total %	Átomos %	Razón Ca:O:C
A	C	41,58	52,52	2,079
	Ca	13,67	5,25	0,683
	O	44,55	42,24	2,217
B	C	37,71	51,45	1,885
	Ca	24,2	7,89	1,21
	O	37,36	38,27	1,868
	P	0,73	0,38	-
C	C	62,9	71,17	3,145
	Ca	7,38	2,54	0,369
	O	22,07	19,05	1,103
	N	6,72	6,63	-
	Na	0,26	0,15	-
	Mg	1,06	0,2	-
	P	0,24	0,11	-
	S	0,36	0,16	-

Por su parte Kumar *et al.* 2006 evaluaron la composición elemental de un cálculo urinario extraído desde una cabra mediante SEM/EDS.

Tabla 10. Composición elemental de un cálculo urinario proveniente de una cabra.

Elemento	Tipo de espectro	Elementos %	Átomos %	Razón Ca:O:C	Número de iones
C	K ED	18,35	26,15	0,917	13,25
Mg	K ED	3,62	2,55	-	1,29
P	K ED	0,18	0,1	-	0,05
Ca	K ED	18,84	8,05	0,942	4,08
O		59,01	63,15	2,95	32
Total		100	100		50,67

Según estos trabajos, la composición química y su relación se mantienen de forma similar a la obtenida por este protocolo en la síntesis cristalina de CaOx. Las variaciones reportadas son propias de los cálculos renales tanto humanos como animales.

Cuando se comenzaron a realizar los EEC en presencia de aditivos se utilizó citrato como control positivo en la cristalización de CaOx, ya que este compuesto orgánico es ampliamente utilizado en el tratamiento sintomático de la urolitiasis humana, como también es utilizado en distintos ensayos de cristalización. En ensayos ejecutados se observan cambios morfológicos (SEM) lo que validaba la técnica y se tendría un punto de comparación con los diferentes MWCNT funcionalizados (Curhan, 2007; Didenko et al., 2014; Eccles J, 2010).

Para poder comprobar si los ensayos eléctricos realizados en esta tesis de magíster se desarrollaron los datos electroquímicos de los experimentos y se plantea como hipótesis si realmente existe un efecto o no de la temperatura en los ensayos como también el efecto de cada uno de los tratamientos (**VER ANEXO 1**). (Balzarini *et al*, 2008; Grupo Infostat, 2008)

De acuerdo a los datos electroquímicos desarrollados se comprueba que existen diferencia entre temperaturas y tratamientos Por lo que podemos deducir que las variables (Temperatura y Tratamiento) son importantes en la modulación de los ensayos de electrocristalización.

Los picos de intensidad de oxalato y oxígeno fueron muy similares a la composición química elemental reportada para los cristales **COD (Figura 54)** y **COM (Figura 59)** previamente (Sánchez, 2013; Neira-Carrillo *et al*, 2015). Demostrando que mediante protocolo propuesto es posible obtener cristales CaOx con diferente morfología, tamaño, agregación, estructura cristalina, organización a nanoescala, etc.

Las curvas de difracción de rayos X (XRD) compararon los espectros obtenidos con los que se conocen en la literatura. Se visualiza un patrón mixto cristalino donde predominaban picos cristalográficos COM pero también existían picos de cristales COD. En las muestras en presencia de MWCNT funcionalizados se observan disminuciones de la intensidad de difracción de los cristales y esto se traduce en cambios morfológicos de los

cristales formados, como es posible de ver desde la figura 35 a la figura 39. (Neira-Carillo *et al*, 2015)

Los distintos aditivos utilizados: Citrato e IA como grupos ácidos y MMI y MODI como grupos esterés, nos traen la siguiente interrogante ahora que ya sabemos que existen cambios en las morfologías como en polimorfismos de los cristales, describiendo una posible explicación de este fenómeno. Addadi y Weiner en 1985 plantearon que al contactar carbonato de calcio en presencia de una proteína, esta era capaz de cambiar su polimorfismo, creciendo más una cara versus las demás pero esto no nos dice mucho de que efecto estaría teniendo directamente esa proteína en el desarrollo de la reacción. Deng y su grupo plantearon en un mini review como en carbonato de calcio podría cambiar su morfología en presencia de grupos carboxilo y éster y se puede plantear que estas proteínas de una u otra manera impiden que se forme el cristal.

Dentro de la reacción electroquímica, el ion oxalato (Ox^{-2}) al poseer 2 valencias, puede atraer a los iones calcio (Ca^{+2}) y de esta manera formar oxalato de calcio. Pero si los iones calcio de una u otra manera no se encuentran disponibles en la solución por acción de los aditivos formando distintas interacciones covalentes dentro de la solución propuesta, podría ser una diferencia entre los grupos ácidos y esterés, siendo los ácidos los que podrían de mejor manera capturar estos iones y siendo los esterés los segundos en capturar y que la diferencia entre citrato e IA fuese que citrato estaba en solución como citrato de sodio como posible explicación que no se solubilizo podrían ser de esta manera una explicación a lo que se vio en las curvas electroquímicas, donde las moléculas su forma tendría algo que ver con lo ocurrido. (Ver Anexo 2)

Por esto es importante para futuras tesis en esta manera analizar de igual medida la solución electroquímica y visualizar que ocurrió con la cantidad de calcio que no se observó en la solución y de esta manera estar un poco más cerca de entender como las proteínas impiden en cierta medida la formación de cálculos urinarios.

CONCLUSIÓN

1. Se obtuvo un control selectivo de la morfología de los cristales CaOx al variar las condiciones en que se realiza el ensayo de electrocristalización mediante cronopotenciometría. Lo anterior se evidencia por la precipitación de cristales COD (Figura 28) y COM (Figura 45) sobre la superficie de los electrodos de trabajo (WE).
2. La temperatura y cierre de la celda electroquímica afectaron la nucleación, crecimiento y agregación de cristales CaOx. El incremento en la temperatura enlentecería la cinética de la reacción de electrocristalización de CaOx. La superficie de los WE fue cubierta por CaOx de gran tamaño ($>100\ \mu\text{m}$) en celdas electroquímicas sometidas a 60°C . Además, se obtuvieron cristales CaOx de menor tamaño ($3\ \mu\text{m}$ a $20\ \mu\text{m}$) sometidas a temperaturas menores (23°C).
3. La composición química elemental de CaOx electrodepositado sobre los WE pueden determinarse mediante SEM/EDS. Los resultados por EDS fueron consistentes con lo reportado en literatura.
4. XRD confirmó la morfología y estructura de los cristales CaOx. Nuestros resultados indican que se obtuvo principalmente cristales COM con predominancia de planos (222), las cuales fueron identificadas por presencia de picos de difracción entre $25,8$ - $26,2^\circ$, e intensidad mayor a 70.000 (2θ) en algunos casos. Los MWCNT funcionalizados son capaces de modular eficientemente la intensidad de algunos picos cristalinos, no así de modificar el polimorfismo.
5. MWCNT funcionalizados con grupos ácidos resultaron ser inhibidores más eficientes que el citrato, los cuales mostraron el siguiente orden: $\text{MODI} < \text{MMI} < \text{IA}$. El efecto observado de los CNT fue muy similar a temperaturas de 37 y 60°C . Se demuestra que a medida que aumenta la temperatura, aumenta el voltaje en las cronopotenciometrías para cada una de las corrientes analizadas a 37°C y 60°C . Sin embargo, el hecho anterior ocurre de manera inversa en presencia de todos los aditivos, es decir, disminuye el voltaje al aumentar la temperatura. Las curvas cronopotenciométricas pierden su pendiente al aumentar la temperatura.

6. Finalmente, nuestros resultados sugieren que la técnica de electrocristalización constituiría un método de cristalización efectivo y novedoso para evaluar nuevos aditivos y/o moldes moduladores de la morfología, estructura y polimorfismo de CaOx.

BIBLIOGRAFÍA

ADDADI, L; WEINER, S. 1985. Interactions between acidic proteins and crystals: Stereochemical requirements in biomineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 82: 4110-4114.

ALIOFKHAZRAEI, M; HAMDY, A. 2016. Handbook of Nanoelectrochemistry. *Springer International Publishing*.1451.

ANDERSEN, A. 2012. Electrodeposition of metal oxides for solar cell applications. Master of Science in Physics and Mathematics. *Norwegian University of Science and Technology, Department of Physics*.

ANIPA, T; ANOOP,K; PAI, K. 2015. Hexagonal columnar liquid crystal as processing additive to P3HT PCBM photoactive layer. *New Journal of Chemistry*. DOI: 10.1039/C5NJ01350J.

AOKI, Y; HUANGA, J; KUNITAKE, T. 2009. Electro-conductive nanotubular sheet of indium tin oxide as fabricated from the cellulose template. *Journal of materials chemistry*, 16:292-297.

ARGADE, S.; CHEN, T. SHAW, T.; BERECZ, Z.; SHI, W. CHAUDHRY, B.; SUR, L. 2015. An evaluation of Tamm-H An evaluation of Tamm–Horsfall protein glycans in kidney stone formers using novel techniquesorsfall protein glycans in kidney stone formers using novel techniques. *Urolithiasis*. doi: 10.1007/s00240-015-0775-3.

AZACETA ,E; TENA-ZAERA,R; MARCILLA ,R., FANTINI S; ECHEBERRIA , J; POMPOSO ,J ; GRANDE,H; MECERREYES , D.2009. Electrochemical deposition of ZnO in a room temperature ionic liquid: 1-Butyl-1-methylpyrrolidinium bis(trifluoromethane sulfonyl)imide. *Electrochemistry Communications*.11: 2184–2186.

BALLESTEROS J.; CHAINET , E.; OZIL , P; MEAS, Y; TREJO, G. 2011. Electrodeposition of copper from non-cyanide alkaline solution containing tartrate. *Int. Journal of Electrochememistry Science*. 6: 2632 - 2651.

BALZARINI, M; DI RIENZO, A; CAZANOVES, F; GONZÁLEZ, L; TABLADA, M; GUZMÁN, W; ROBLEDO, W. 2008. InfoStat software estadístico InfoStat versión 2008, Manual de usuario, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2008.

- BAZIN, D.; CHEVALIER, S.; SAADAOU, H.; SANTARELLI, X.; LARPENT, C.; FERACCI, H.; FAURE, C.** 2012. Electrodeposition of polymer nanodots with controlled density and their reversible functionalization by polyhistidine-Tag proteins. *Langmuir*. 28: 13968-13975.
- BECK, F.** 1988. Electrodeposition of polymer coatings. *Electrochimica Acta* 33: 839–850.
- BESRA, L.; LIU, M.** 2007. A review on fundamentals and applications of electrophoretic deposition (EPD). *Polymers in Materials Science*. 52: 1-61.
- BICELLI, L.; BOZZINI, B.; MELE, C.; D'URZO, L.** 2008. A review of nanostructural aspects of metal electrodeposition. *International Journal of Electrochemical Science*. 3: 356 - 408.
- BIGELOW, M.; WIESSNER, J.; KLEINMAN, J.** 1997. Surface exposure of phosphatidylserine increases calcium oxalate crystal attachment to IMCD cells . *American Journal of Physiology*. 272: 55-62.
- BISWAS, N.; PRIYANKA, G.; SARKAR, S.; MOITRA, D.; SUNIRMAL J.; KUMAR, A.** 2015. Nanomechanical properties of dip coated indium tin oxide films on glass. *Thin Solid Films*. 579: 21-29.
- BORISSOVA, A.; GOLTZ, G.; KAVANAGH, J.; WILKINS, T.** 2010. Reverse engineering the kidney: modeling calcium oxalate monohydrate crystallization in the nephron. *Medical and Biological Engineering. and Computing*. 48: 649-659.
- BOZZINI, B.; LACITIGNOLA D.; MELE, C.; SGURA, I.** 2012. Morphogenesis in metal electrodeposition. *Note Matematics*. 32: 7-46.
- BURZYŃSKA, L.; RUDNIK, E.; KOZA, J.; BŁAŻ, L.; SZYMAŃSKI, W.** 2008. Electrodeposition and heat treatment of nickel/silicon carbide composites. *Surface & Coatings Technology*. 202: 2545-2556.
- CAO, C.; FU, J.; HESUN, Z.** 2002. Carbon nitride thin films deposited by cathodic electrodeposition. *International Journal of Modern Physics B*. 16: 1138-1142.

- CASELLA, I.** 2002. Electrodeposition of cobalt oxide films from carbonate solutions containing Co(II)–tartrate complexes. *Journal of Electroanalytical Chemical*. 520: 119-125.
- CHAPMAN, B.; ANDERSON, J.** 1974. *Science and Technology of Surface Coating*, Academic Press. 1974:69.
- CHEN, A.** 2004. Electrodeposition of conducting polymer fibers. *Department of Mechanical engineering in partial fulfillment of the requirements for the degree of bachelor of science in mechanical engineering at the Massachusetts Institute of Technology June 2004*.
- CHO, K.; LOGET, G.; CORN, R.** 2014. Lithographically patterned nanoscale electrodeposition of plasmonic, bimetallic, semiconductor, magnetic, and polymer nanoring Arrays. *The Journal of Physical Chemistry C*. 118: 28993-29000.
- CHOWDHURYA, M.; CHAKRABORTYB, B.; PAL, A.** 2004. Novel electrodeposition route for the synthesis of mixed boron nitride films. *Material Letters*. 58: 3362 – 3367.
- CHUTIPONGTANATE, S.; CHAIYARIT, S.; THONGBOONKERD, V.** 2012 Citrate, not phosphate, can dissolve calcium oxalate monohydrate crystals and detach these crystals from renal tubular cells. *European Journal of Pharmacology*. 689: 219-225.
- CURHAN, G. C.** 2007. Epidemiology of stone disease. *Urologic Clinics of North America*. 34: 287-293.
- DA, G.; SHKIL, H.; SCHUHMANN, W.** 2009. Electrodeposition polymers as immobilization matrices in amperometric biosensors: improved polymer synthesis and biosensor fabrication. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 395: 1693-706.
- DASILVA, M.; SCHNEIDER, MATHEW.; WOOD, D.; KIM, B.; STACH, E.; SANDS, T.** 2009. The use of polyethyleneimine to control the growth-front morphology of electrochemically deposited gold nanowires for engineered nanogap electrodes. *Small*: 5: 2387–2391.
- DENG, H; SHEN, X; WANG, X; DU, C.** 2013. Calcium carbonate crystallization controlled by functional groups. A mini-review. *Frontiers of materials science*. 7: 61-68.

DIDENKO,L.; TOLARDAVA,E.; PERPANOVA, T.; SHEVLYAGINA, T.; BORAVAYA, Y.; ROMANOVA, Y.; CAZZANIGA, M.; CURIA, R.; MILANI; SAVOIA, C.; TATTI, F. 2004. Electron microscopy investigation of urine stones suggests how to prevent post-operation septic complications in nephrolithiasis . *Journal of Applied Medical Sciences*, 3: 2241-2336.

DINI, J.; SNYDER, D 2010. Electrodeposition of copper. Modern electroplating, fifth Edition Edited by Mordechay Schlesinger and Milan Paunovic Copyright John Wiley & Sons, Inc.

DOVE, P.; DE JOREO, J.; WEINER, S. 2003. Biomineralization. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*. 54: 151-187.

DURNET, L. 1984. Electrochemical engineering handbook. Fourth Edition, Van Nostrand Reinhold Co., Inc. New York.

ECCLES, J. 2010. Obstructive urolithiasis (Bladder Stones) in Cattle. *Norther Territory Government*. 57: 844.

ELWELL, D.; FEIGELSON, R.; SIMKINS, M. 1982. Electrodeposition of silicon carbide. *Materials Research Bulletin*. 17: 697-706.

ESCOBAR, C.; BYER, K.; KHAN, S. 2007. Naturally produced crystals obtained from kidney stones are less injurious to renal tubular epithelial cells than synthetic crystals. *BJU International*. 100: 891-897.

EVAN, A. 2010. Physiopathology and Etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract. *Pediatric Nephrology*, 25:831-841.

FENG, P.; YANG, P.; SHI, Y. 2006. Effect of bias voltages on the synthesis of nanostructured carbon nitride films. *Journal. of Crystal Growth* 291: 22-26.

FINLAYSON, B.; REID, F. 1978. The expectation of free and fixed particles in urinary stone disease. *Investing Urology*. 15: 442-448.

- FLORENCE, F.; NISHA, N.; RAJENDRAN; N.; SRINIVASAN, K.; JOHN, S.** 2011. Studies on Electrodeposition of Copper from methanesulphonic acid Bath. *International Journal of ChemTech Research*. 3: 1318-1325.
- GAMBURG, Y.; ZANGARI, G.** 2011. Theory and practice of metal electrodeposition.
- GÓMEZ, G.; POLLINA, R.; VALL, E.** 1995. Nickel electrodeposition on different metallic substrates. *Journal of Electroanalytical Chemical*. 386: 45 -56.
- GOODS, J.; KELLY, J.; TALIN, A.; MICHAEL, J .; WATSON, R.; HACHMAN , J.** 2005. Electrodeposition of nickel from low temperature sulfamate electrolytes. *The Journal of Electrochemical Society*. 1-47.
- GREEN, T.** 2007. Gold Electrodeposition for microelectronic, optoelectronic and microsystem applications. *Gold Bulletin* 40/2.
- GRUJICIC, D.; PESIC, B.** 2002. Electrodeposition of copper: the nucleation mechanisms. *Electrochimica Acta*. 47 : 2901-2912.
- GRUPO INFOSTAT.** 2008. InfoStat software estadístico InfoStat versión 2008, Manual de usuario, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2008.
- IBRAHIM, M.; F. KOOLIL.; ALAMRI, S.** 2013. Electrodeposition and characterization of Nickel–TiN microcomposite coatings. *International Journal of Electrochemical Science*. 12308 - 12320.
- JOSEPH S.; KAMATH V.** 2008. Electrochemical deposition of Cu₂O on stainless steel substrates: Promotion and suppression of oriented crystallization. *Solid State Science*. 10: 1215.
- JOSEPH, S.; KAMATH, V.** 2010. Syntesis of different polymorphic modifications of calcium oxalate by electrodeposition. *Journal of Solid State Electrochemical* 14:1481-1486.
- KAROONIAN, F.; ETESAMI, M.; NORITA, M.** 2012. Electrodeposition of Au on Reticulated vitreous carbon from chloride media by an electrogenerative Process. *International Journal of Electrochemical Science*. 7: 3059-3071.
- KATO, Y.; YAMAGUCHI, S.; YACHIKU, S.; NAKAZONO, S.; HORI, J., WADA, N.; HOU, K.** 2004. Changes in urinary parameters after oral administration of potassium-sodium citrate and magnesium oxide to prevent urolithiasis. *Urology*. 63:7-12.

KEKESI, T.; ISSHIKI, M. 1997. Electrodeposition of copper from pure cupric chloride hydrochloric acid solutions. *Journal of Applied Electrochemical*. 27: 982-990.

KETRANE, R.; SAIDANI, B.; Y COLS, G. 2009. Efficiency of five scale inhibitors on calcium carbonate precipitation from hard water: Effect of temperature and concentration. *Desalination*. 249: 1397-1404.

KETRANE, R.; SAIDANI, B.; GIL, O.; LELEYTER, L.; BARAUD, F. 2006. Efficiency of five scale inhibitors on calcium carbonate precipitation from hard water: Effect of temperature and concentration, *Desalination* . 249:1397-1404

KHAN, A.; BOSTON, I.; HEARLEY, J. 2004. Method of depositing a wear resistant seal coating and seal system. US 7851027 B2. 23 Sep. 2004.

KHAN, S.; CANALES, B. 2009. Genetic basis of renal cellular dysfunction and the formation of kidney stones. *Urological Research*. 37: 169-180.

KHRYPUNOV, G.; KLOCHKO, N.; VOLKOVA, N.; KOPACH, V.; LYUBOV, K.; KLEPIKOVA, K. 2011. Pulse and direct current electrodeposition of zinc oxide layers for solar cells with extra thin absorbers. *World renewable energy congress 2011 Sweden, 8- 13 may 2011 Linköping, Sweden*. 57:11-22.

KIM, J.; TISHER, T.; MADSEN, K. 1996. Role of apoptotic and nonapoptotic cell death in removal of intercalated cells from developing rat kidney. *American Journal of Physiology*. 270: 575- 592.

KLEINMAN, J.; ALATALO, L.; WESSON, J. 2008. Acidic polyanion poly(acrylic acid) prevents calcium oxalate crystal deposition. *Kidney International*. 74:919-924.

KOA, J.; PARKA, D.; MYUNGA, N.; CHUNGB, J.; NOBE, K. 2002. Electrodeposited conducting polymer–magnetic metal composite films. *Synthetic Metals*. 128: 47-50.

KOHL, P. 2010. Electrodeposition of gold. *Modern Electroplating, Fifth Edition* Edited by Mordechai Schlesinger and Milan Paunovic Copyright John Wiley & Sons, Inc.

KOK, D.; KHAN, S. 1994. Calcium oxalate nephrolithiasis, a free or fixed particle disease. *Kidney International*. 46: 847-854.

- KUMAR, N.; SINGH, P.; KUMAR, S.** 2006. Physical, X-ray diffraction and scanning electron microscopic studies of uroliths. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 43: 226-232.
- KUSHKHOV, K.; ADAMOKOVA, M.** 2007. Electrodeposition of tungsten and molybdenum metals and their carbides from low-temperature halide-oxide melts. *Russian Journal of Electrochemistry*. 43: 997-1006.
- LEE, H.; LEE, K.; KIM, C.** 2014. Electrodeposition of manganese-nickel oxide films on a graphite sheet for electrochemical capacitor applications. *Materials* 7: 265-274.
- LEWIS D., SKÖLD K.** 1990. A phenomenological study of the fleischmann-pons effect. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 294: 275-288.
- LI, C.; CAO, C.; ZHU, H.; QIANG, L.; ZHANG, J.; XIANG, X.** 2004. Electrodeposition route to prepare graphite-like carbon nitride. *Materials Science and Engineering B* 106: 308-312.
- LI, C.; DENG, Y.; SUN, B.** 2009. Taurine protected kidney from oxidative injury through. Urolithiasis previously Urological Research. 37(4):211-20 4: 211.
- LI, C.; LI, X.; WANG, Z.; GUO, H.** 2007. Nickel electrodeposition from novel citrate bath. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*. 17: 1300-1306.
- LI, C.; CAO, C.; ZHU, H.** 2004. Graphitic carbon nitride thin films deposited by electrodeposition. *Materials Letters*. 58: 1903-1906.
- LIEBERTHAL, W.; LEVINE, J.** 1996. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injur. *American Journal of Physiology*. 271: 477-488.
- LIEBERTHAL, W.; TRIACA, V.; LEVINE, J.** 1996. Mechanism of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs necrosis. *American Journal of Physiology*. 270: 700- 708.
- LIN, T.; A LIN, A.; LIU, H.; SHEU, J.; HUNG, W.** 2011. Potential-controlled electrodeposition of gold dendrites in the presence of cysteine. *Chemical Communications*. 47: 2044-2046.

- LIU, N; LUO, F; WU, H; LIU, Y; ZHANG, C; CHEN, J. 2008.** One-step ionic-liquid-assisted electrochemical synthesis of ionic-liquid-functionalized graphene sheets directly from graphite. *Advanced Functional Materials* 18: 1518–1525.
- LIU, Q.; XU, J.; CHANG, Z.; ZHANG, X. 2014.** Direct electrodeposition of cobalt oxide nanosheets on carbon paper as free-standing cathode for Li–O₂ battery. *Journal of Material Chemistry*. **A2**: 6081-6085.
- LUO, L.; LÜ, G.; LI, B.; CHEN, Z.; YIWEN, T. 2010.** Controlled growth of ZnO array on FTO glass substrate by electrodeposition. *Wuhan University Journal of Natural Sciences*, 15: 130-134.
- M EUVRARD, M.; FILIATRE, C.; CRAUSAZ, E.2000.** A cell to study in situ electrocrystallization of calcium carbonate. *Journal of Crystal Growth*. 216: 466-474
- MA, Y.; DI, J.; YAN, X.; MEILIAN, Z.; LU, Z.; TU, Y. 2009.** Direct electrodeposition of gold nanoparticles on indium tin oxide surface and its application. *Biosensors and Bioelectronics*. 24: 1480-1483.
- MAHDAVI, M.; ABEDINI, E.; BAGHERPOUR, S.; HEIDARI, V. 2015.** High voltage electro deposition of carbon nitride film on aluminum surface. *International Journal of Refinery Metals and Hard Metal*. 48: 355-358.
- MALYSHEVA, V.; GABB, A.; SHAKHNINA, D.; PISANENKOA, A.; AMBROVAC, M.; DANIELIKC, M.; FELLNERC, P. 2012.** Review of the electrodeposition of molybdenum carbide on the surfaces of disperse dielectric and semiconductor materials. *Acta Chimica Slovenian*. 5: 139-144.
- MALYSHEVA, V.; PISANENKOA, A.; SOLOVIEV, A.; GABB, A.; CHERNENKO, V. 2014.** Electrodeposition of tungsten and molybdenum carbide onto the surfaces of disperse dielectric and semiconductor materials. *Mat.-wiss. u. Werkstofftech*. 45: 51-56.
- MANN, S. 2001.** Biomineralization principles and concepts in biorganic materials Chemistry. School of Chemistry, University of Bristol. Bristol UK. Cap 1, 1-2. mitochondrial-linked pathway in a rat model of nephrolithiasis. *Urological Research*. 37: 211-220.

- MAY-PAT, A.; AVILÉS, F.; TORO, P.; YAZDANI-PEDRAM, M.; CAUCH-RODRIGUEZ, J.** 2012. Mechanical properties of PET composites using multiwalled carbon nanotubes functionalized by inorganic and itaconic Acids. *eXPRESS Polymer Letters* . 6: 96-106.
- MIRANDA, J.** 2010. Síntesis y caracterización de nanocompósitos de polipropileno heterofásico y nanotubos de carbono multipared. *Laboratorio de Polímeros. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile*.
- MOE, O.** 2006. Kidney stones: pathophysiology and medical management. *The Lancet*, 367: 333-344.
- MOHAMADEN, W.; WANG, H.; GUAN, H. MENG, X.; LI, J.** 2014. Immunohistochemical localization and mRNA quantification of osteopontin and Tamm-Horsfall protein in canine renal tissue after potassium oxalate injection. *BMC Veterinary Research*. 10:70.
- MONJE, P.; BARAN, E.** 2002. Characterization of calcium oxalates generated as biominerals in cacti. *Plant Physiology*. 128: 707-713.
- MONNERON, M. C.; GILLBERG, P. G.; OHMAN, B.;ALBERTS, P.** 2000. In vitro alpha-adrenoceptor autoradiography of the urethra and urinary bladder of the female pig, cat, guinea-pig and rat. *Scandinavian Journal and Urology and Nephrology*. 34: 233-238.
- MULLIN, J.** 1993. *Crystallization*. 4 ed, ed. B. Heinemann.Oxford.
- NEIRA-CARRILLO, A.; PONCE, F.; VÁSQUEZ-QUITRAL, P; YAZDANI-PEDRAM, M.; FERNÁNDEZ, S.; CÖLFEN, H.; ARIAS, J.L.** 2015. Preparation of sulfonated polymethylsiloxane as additive for the selective calcium oxalate crystallization. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2015:1167–1177.
- NEIRA-CARRILLO, A.; VÁSQUEZ-QUITRAL, P.** 2010. Formación de Cálculos Renales de Oxalato Cálcico en Mamíferos. *Avances Ciencias Veterinarias*. 25:41-52.
- NEIRA-CARRILLO, A.; VÁSQUEZ-QUITRAL, P.; FARHADI-KHOUZANI, FERNÁNDEZ, S.; ARIAS, J; YAZDANI-PEDRAM, M; CÖLFEN, H.** 2015.

Funcionalized multiwalled carbon nanotubes as template for crystal growth of calcium carbonate. Datos no publicados, Submission ASAP-2016.

NEIRA-CARRILLO, A.; VASQUEZ-QUITRAL, P.; SANCHEZ, M.; VARGAS-FERNANDEZ, A.; SILVA, J.F. 2015. Control of calcium oxalate morphology through electrocrystallization as an electrochemical approach for preventing pathological disease. *IONICS*.21: 3141-3149.

ONICIU, L.; MURESAN, L. 1991. Some fundamental aspects of levelling and brightening in metal electrodeposition. *Journal of Applied Electrochemistry*.21: 565-574.

OSBORNE, C.; LULICH, J.; FORRESTER, D.; ALBASAN, H. 2009. Paradigm Changes in the Role of Nutrition for the Management of Canine and Feline Urolithiasis. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*. 2009: 127-141.

PAPPACENA, K.; JOHNSON, E.; XIE, S.; FABER, K. 2010. Processing of wood-derived copper–silicon carbide composites via electrodeposition. *Composites Science and Technology*. 70: 485-491.

PETIT, M.; VINCENT PLICHON, V.1998. Anodic electrodeposition of iridium oxide films. *Journal of Electroanalytical Chemical*.444: 247-252.

PEULON, S.; DANIEL LINCOT, D. 1998. Mechanistic Study of Cathodic Electrodeposition of Zinc Oxide and Zinc Hydroxychloride Films from Oxygenated Aqueous Zinc Chloride Solutions. *Journal of Electrochemical Society*. 145: 864-874.

PLUMERÉ, N; SPEISER, B; DIETRICH, B; ALBERT, K; PESEK, J; MATYSKA, J. 2009. Thermally induced radical hydrosilylation for synthesis of C18 HPLC phases from highly condensed SiH terminated silica surfaces. *Langmuir* 25: 13481-13487.

PRIYA-AGGARWAL, K.; NARULA, S.; KAKKAR, M.; TANDON, C. 2013. Nephrolithiasis: Molecular mechanism of renal stone, formation and the critical role played by modulators. *BioMed Research International*. 2013: 1-9.

RAILA, J.; SCHWIGERT, F.; KOHN, B. 2014. Relationship between urinary Tamm-Horsfall protein excretion and renal function in dogs with naturally occurring renal disease. *Veterinary Clinical Pathology*. 43: 261-265.

- RANDALL, A.** 1940. The etiology of primary renal calculus. *International abstracts of surgery*. 71: 209-240.
- ROY, R.; PAL, A.** 2005. Synthesis of gallium nitride films by a novel electrodeposition route. *Material Letters* 59: 2204 - 2209.
- SAKAI, N.; FUJIWARA, Y.; ARAI, M.; YU, K.; TATSUMA, T.** 2009. Electrodeposition of gold nanoparticles on ITO: Control of morphology and plasmon resonance-based absorption and scattering. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 628: 7-15.
- SAKURAI, Y.; OKUDA, H.; NISHIGUCHI, N.; NAGAYAMA, N.; YOKOYAMA, M.** 2013. Microlens array fabrication based on polymer electrodeposition. *Journal of Material Chemistry*. 13: 1862-1864.
- SANCHIS, P.** 2008. Estudios de los Procesos Patológicos de Cristalización: Litiasis Renal, Calcificaciones Cardiovasculares y Osteoporosis. *Universitat de les Illes Balears España. Laboratori d'Investigació en Litiasi Renal .Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut. Departament de Química*. Cap 1, 7-19, Cap 2, 27-47.
- SAYAN, P.; TITIZ SARGUT, S.; KIRAN, B.** 2009. Calcium oxalate crystallization in the presence of amino acids, proteins and carboxylic acids. *Crystal Research and Technology*. 44: 807-817.
- SHAN, G.; YANG, G.; JIA, Y.; SU, Z.; QU, L.** 2007. ITO electrode modified with chitosan nanofibers loading polyoxometalate by one step self-assembly method and its electrocatalysis. *Electrochemical Communications*. 9: 2224-2228.
- STERN, K.; ROLISON, D.** 1990. Studies of Chromium Carbide Electrodeposition in Molten Fluorides. *J. Electrochememical Society*. 137: 178-183.
- SUDAMCHAVHAN, E.; MARZIAPADERI, P.; FANTINI, S.; UNGUREANU, M.; GRANDE, O.; TENA-ZAERA, R.** 2012. NiO cathodic electrochemical deposition from an aprotic ionic liquid: building metal oxide n-p heterojunctions. *Electrochimica Acta*. 71: 39-43.

- THOMAS, A.** 2009. Biomimetic growth and morphology control of calcium oxalates. *Der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden . Deutschland*. Cap 1, 1-26.
- THONGBOONKERD, V.; SEMANGOEN, T.; CHUTIPONGTANATE, S.** 2006. Factors determining types and morphologies of calcium oxalate crystals: molar concentrations, buffering, pH, stirring and temperature. *Clinical Chim Acta*, 367: 120-131.
- TSAI, W.; PHSU, C.; HWU, Y.; CHEN, C.; CCHANG, L.; JE, J.; LIN, H.;GROSO, A.; MARGARITONDO, G.** 2002. Building on bubbles in metal electrodeposition. *Nature* .417: 139.
- TSUJIHATA, M.** 2007. Mechanism of calcium oxalate renal stone formation and renal tubular cell injury. *The Japanese Urological Association*. 15: 115-120.
- USMANI, M.** 1980. Electrodeposition of polymers and coatings. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*. 15: 115-135.
- VERKOELEN, C.; VERHULST, A.** 2007. Proposed mechanisms in renal tubular crystal retention. *Kidney International*. 72: 13–18.
- WANG, C; CHEN, S; YANG, X; LI , L.** 2004. Investigation of chloride-induced pitting processes of iron in the H₂SO₄ solution by the digital holography. *Electrochemistry Communications*.6: 1009-1015.
- WANG, X; LIU, Z.** 2012. Carbon nanotubes in biology and medicine: An overview. *Chinese Science Bulletin*. 57: 167-180.
- WESSON, J.; WARD, M.** 2007. Pathological Biomineralization of Kidney Stones. *Elements*. 3: 415-421.
- XIAO, L.; YONGSENG, P.** 2015. Roles of osteopontin gene polymorphism (rs1126616), osteopontin levels in urine and serum, and the risk of urolithiasis: A meta-analysis. *BioMed Research International*. 2015: 315043.
- YANG, B.; LI, H.; SHI, C.; FENG, P.** 2012. Nano-particles and films of carbon nitride prepared by using the simple plasma sputtering deposition techniques. *Surface Review and Letters*. 13: 847-853.

YAO, C.; QI, C.; ZHU, J.; XU, W. 2010. Unusual morphology of calcium carbonate controlled by amino acids in agarose gel. *Journal of The Chilean Chemistry Society*. 55:270-273.

YU, H.; SHEIKHOLESAMI, R.; DOHERTY, W. 2004. The effects of silica and sugar on the crystallographic and morphological properties of calcium oxalate. *Journal of Crystal Growth*. 265:592-603.

ZHANG, Y.; TAO, J.; FENG, N.; HAN, X. 2008. Crystal growth of calcium oxalate induced by the extracts of semen plantaginis and folium pyrrosiae. *Crystal Research and Technology*. 43: 931-934.

ZHAO, J; CHEN, G; ZHU, L; LI, G. 2011. Graphene quantum dots-based platform for the fabrication of electrochemical biosensors. *Electrochemistry Communications*.13: 31-33.

ANEXOS

ANEXO N°1: Diseño completamente aleatorizado con parcelas divididas, factores cruzados con medidas repetidas.

Siendo $T_j = [Tratamiento_\alpha + Temperatura_\beta + (Tratamiento * Temperatura)_{\alpha\beta}]$

$$Y = \mu + M_i + T_j + t_k + (Mt)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

Y = Voltaje obtenido.

μ = Media General

M_i = Parcela Principal, Muestra.

T_j = Tratamiento y temperatura con su interacción.

t_k = efecto de las sub-parcela tiempo en medidas repetidas en el tiempo.

$(Mt)_{ik}$ = Interacción efecto sub-parcela dentro de la parcela principal.

ε_{ijk} = Es el residual aleatorio.

En este modelo con un total de 10 tratamientos incluyendo los controles cada uno con 2 réplicas experimental con 150 datos de medidas repetidas, se desarrolló el modelo en Infostat y los resultados fueron los siguientes:

<u>N</u>	<u>AIC</u>	<u>BIC</u>	<u>logLik</u>	<u>Sigma</u>	<u>R2_0</u>	<u>R2_1</u>	<u>R2_2</u>
3000	-10516,86	-10414,81	5275,43	0,10	0,94	0,99	0,99

Se obtuvieron criterios de información bayesiana y de akake con un buen ajuste, el modelo posee una desviación estándar de 0,1 V y un coeficiente de determinación ajustado de un 99%

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	2979	881,03	<0,0001
Tratamiento	4	10	43,42	<0,0001
Temperatura	1	10	5,35	0,0434
Tratamiento:Temperatura	4	10	1,47	0,2821

Se determinaron que existen diferencias entre las temperaturas y de al menos un tratamiento respecto al control con un alfa de 0,05.

Parámetros de los efectos aleatorios

Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: pdIdent

Formula: ~1|Muestra

Desvíos estándares y correlaciones

	(const)
(const)	0,18

Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: pdIdent

Formula: ~1/Tiempo Dentro Muestra

Desvíos estándares y correlaciones

	(const)
(const)	0,02

Intervalos de confianza (95%) para los parámetros de los efectos aleatorios

Formula: ~1|Muestra

	LI(95%)	Est.	LS(95%)
sd(const)	0,12	0,18	0,28

Formula: ~1/Tiempo Dentro Muestra

	LI(95%)	Est.	LS(95%)
sd(const)	0,01	0,02	0,05

Intervalo de confianza (95%) para sigma

	lower est.	upper
sigma	0,09	0,10

Voltaje - Medias ajustadas y errores estándares para Tratamiento

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: Bonferroni

Tratamiento	Medias	E.E.	
Control	2,23	0,09	A
Citrato	1,05	0,09	B
MWCNT-MMI	0,98	0,09	B
MWCNT-MODI	0,98	0,09	B
MWCNT-IA	0,73	0,09	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Voltaje - Medias ajustadas y errores estándares para Temperatura

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: Bonferroni

Temperatura	Medias	E.E.	
37C	1,29	0,06	A
60C	1,10	0,06	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Voltaje - Medias ajustadas y errores estándares para Tratamiento*Temperatura

LSD Fisher (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: Bonferroni

Tratamiento	Temperatura	Medias	E.E.	
Control	60C	2,32	0,13	A
Control	37C	2,14	0,13	A
Citrato	37C	1,19	0,13	B
MWCNT-MMI	37C	1,12	0,13	B
MWCNT-MODI	37C	1,07	0,13	B
MWCNT-IA	37C	0,91	0,13	B
Citrato	60C	0,91	0,13	B
MWCNT-MODI	60C	0,88	0,13	B
MWCNT-MMI	60C	0,84	0,13	B
MWCNT-IA	60C	0,55	0,13	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

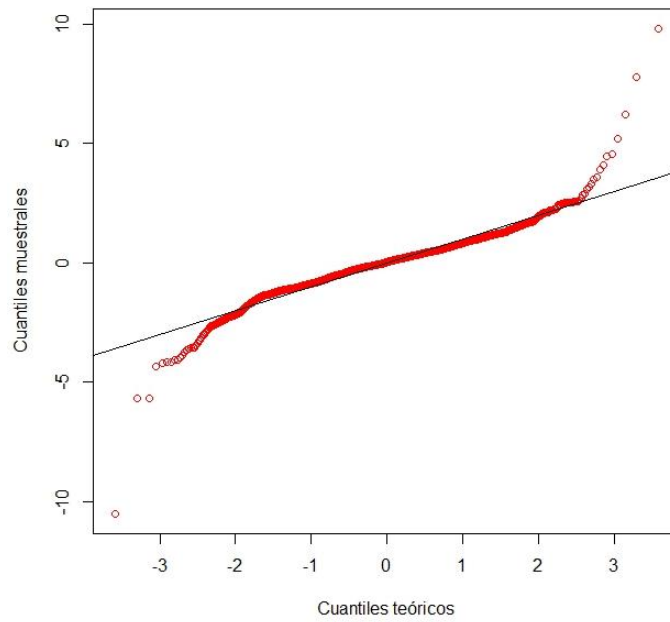


Fig. 1 Q-Q plot teórico del modelo estadístico bajo estandarizaciones de cuantiles muestrales bajo supuestos teóricos.

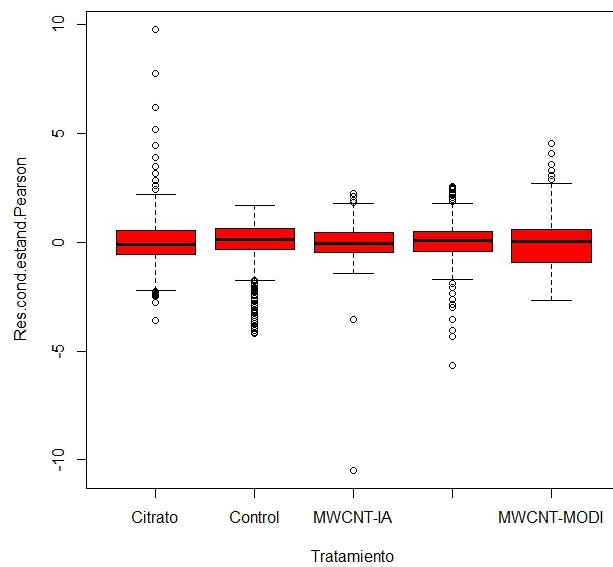


Fig. 2 Box-plot de los tratamientos de acuerdo al modelo planteado para el estudio de acuerdo a los supuestos teóricos.

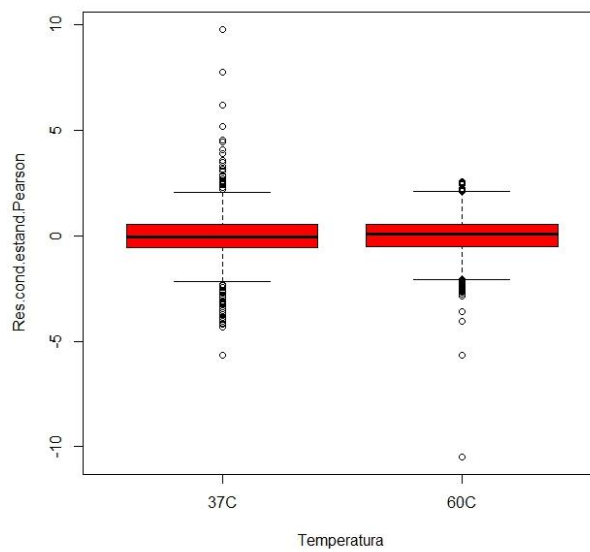


Fig. 3 Box-plot de las temperaturas de acuerdo al modelo planteado para el estudio de acuerdo a los supuestos teóricos.

ANEXO N° 2 Moléculas en diseño 3D.

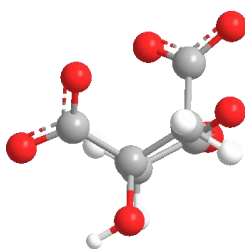


Fig. 4 Citrato en diseño 3D

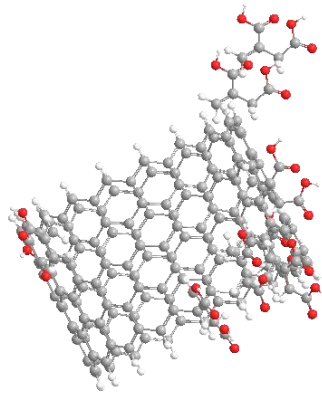


Fig. 5 IA en diseño 3D

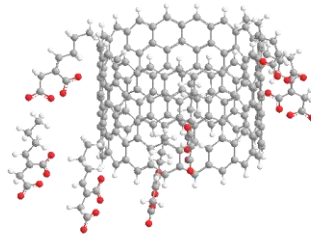


Fig. 5 MMI en diseño 3D

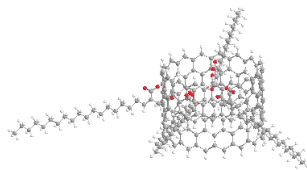


Fig. 6 MODI en diseño 3D