



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

EFFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR EN COMPÓSITOS POLIMÉRICOS

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL QUÍMICA

NATALIA LORETO GALARCE TORO

PROFESOR GUÍA
HUMBERTO PALZA CORDERO

MIEMBROS DE LA COMISIÓN
PABLO CAVIEDES FERNÁNDEZ
BÁRBARA ANDREWS FARROW

SANTIAGO DE CHILE
2013

**RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL
TÍTULO DE: Ingeniera Civil Química
POR: Natalia Loreto Galarce Toro
FECHA: Santiago, Noviembre 2013
PROFESOR GUÍA: Humberto Palza Cordero**

EFFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE COBRE SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR EN COMPÓSITOS POLIMÉRICOS

La ingeniería biomédica ha tenido un gran avance en las últimas décadas, generando biomateriales con alto potencial de uso en el área de la medicina reconstructiva, para la elaboración de prótesis o implantes que deben ser biocompatibles. Paralelamente, se han buscado biomateriales complementarios, que posean capacidad antimicrobiana, pues en la actualidad las infecciones nosocomiales asociadas a implantes, representan el 45% del total de infecciones intrahospitalarias.

En el área de implantes, la elaboración de compósitos a partir de diversas matrices, ha ganado espacio en la ciencia médica. En este aspecto, la inclusión de compuestos poliméricos ha sido ya analizada, pero se continúan investigando nuevas potencialidades o polímeros, en su rol de matriz de nanocompósito. Por su parte, existe amplia literatura sobre los atributos biomédicos del cobre, tales como su carácter biocida y su rol en la regeneración de tejidos endoteliales y óseos, que podrían complementar las propiedades de ciertos compuestos poliméricos.

De esta manera, considerando la alta tasa de infecciones intrahospitalarias por implantes, la capacidad regenerativa y antimicrobiana del cobre, y el creciente desarrollo de nanocompósitos como biomateriales, se abordó el desafío de combinar dos polímeros, Alginato y TEGMA/BisGMA, con cobre. En esta línea, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de nanopartículas de este metal, incorporadas en compósitos poliméricos, sobre la viabilidad de líneas celulares animales y humanas, utilizándose el ensayo de MTT y lixiviación, para estudiar la citotoxicidad y liberación de iones cobre de los compósitos, respectivamente.

Los resultados indicaron que tanto el alginato como el TEGMA/BisGMA generan baja viabilidad celular, ya sea en estado puro o en combinación con cobre. Para el alginato esto se debería a su carácter hidrofílico que dificulta la adherencia y favorece la liberación de iones cobre. Por su parte, la menor viabilidad en el caso del TEGMA/BisGMA, vendría dada por monómeros residuales de la fotopolimerización. De esta manera, al menos en condiciones de laboratorio, la toxicidad de estos compuestos poliméricos no haría recomendable su utilización en contacto con tejido biológico. Sin embargo, se propone estudiar y extender el análisis para ambos polímeros en combinación con cobre, pero enfocándose en usos alternativos como la liberación de soluto en apósito o parche (alginato) o implantes odontológicos (TEGMA/BisGMA), pues pruebas *in vivo* podrían arrojar resultados distintos.

A mi familia: Cecilia, Angel, Daniel

AGRADECIMIENTOS

A mi profesor guía, el doctor Humberto Palza, y a mi profesor co-guía, el Doctor Pablo Caviedes, por el apoyo y dedicación en todo momento.

A mis compañeros del laboratorio de polímeros, en especial a Juanito y Juan, por la ayuda y paciencia. Por estar siempre que tenía alguna duda.

A mis compañeros del laboratorio de medicina, por su apoyo y ayuda incondicional cuando tenía dudas de procedimientos.

A mis compañeros de carrera: Mummy, Javi, Rhidi, Cami V., Pili, Cami S., por aguantarme los últimos años de carrera y compartir gratos momentos. A los más chicos: Angelo y Seba, por acompañarme en esta etapa que termina.

A mis amigos de primer año: Francisco y Andrés, por estar siempre que los necesité, compartiendo es almuerzo de vez en cuando que siempre se alargaba.

A mis compañeros de colegio: Ricardo, Javi, Ñaño, por la compañía y gratos momentos vividos, en especial estos últimos años.

A mis primas: Ale, Sofi, Vivi, por escucharme cuando quería conversar y alojarme cuando necesitaba desestresarme.

A mi hermano, por su amor, cariño, preocupación y apoyo incondicional entregado desde que nací, hasta malcriándome. Gracias Dani, por soportarme y aguantarme, no es fácil, lo sé, pero sabes hacerlo muy bien. ¡Te amo Nanel!

A mis padres, por todo lo ensañado desde que llegué a este mundo. Por el apoyo en todo momento, escuchando mis problemas a cualquier hora, aguantando mi malgenio, que claramente es muy difícil. Gracias Mamá. Gracias Papá. ¡Los amo mucho!

A mis viejos, especialmente a Jorge y Elba, mis santitos que me cuidan desde el cielo y han estado apoyando a mi familia en todo momento. Gracias Tata. Gracias Mama.

¡Gracias..., Totales!

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xi
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
I.1. ANTECEDENTES GENERALES	1
I.2. MOTIVACIÓN DEL PROYECTO	2
I.3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	2
CAPÍTULO II: OBJETIVOS	4
II.1. OBJETIVO GENERAL	4
II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
CAPÍTULO III: ANTECEDENTES	5
III.1. POLÍMEROS COMO MATRIZ	7
III.2. PROPIEDADES Y USOS DEL COBRE	9
III.2.1. Funciones del Cobre	10
III.2.1.1. Nutriente Esencial	11
III.2.1.2. Agente Biocida	11
III.2.2. Toxicidad del Cobre	12
III.2.3. Nuevas Aplicaciones del Cobre	15
III.2.3.1. Infecciones Intrahospitalarias	15
III.2.3.2. Angiogénesis	17
III.2.3.3. Propiedades Antiinflamatorias	19
III.2.3.4. Regeneración Ósea y Muscular	19
III.3. NANOCOMPÓSITOS CON COBRE	21
III.3.1. Estudios del cobre en compuestos poliméricos	21
III.3.2. Polímeros analizados	23
III.3.2.1. Alginato	23
III.3.2.2. TEGMA/BisGMA	27
III.4. CULTIVOS Y LÍNEAS CELULARES	28
CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA	31
IV.1. PREPARACIÓN DE NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS	31
IV.1.1. Preparación de Nanocompuestos de Alginato	31
IV.1.2. Preparación de Nanocompuestos de TEGMA/BisGMA	32
IV.2. PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA CULTIVOS Y SUBCULTIVOS CELULARES	33
IV.2.1. Medio de Cultivo	33
IV.2.1.1. Medio de cultivo sin suero	34

IV.2.1.2.	Medio de cultivo con suero	34
IV.2.2.	Solución D	35
IV.2.3.	Tripsina EDTA 0,2%	36
IV.3.	PREPARACIÓN DE CULTIVOS Y SUBCULTIVOS CELULARES	36
IV.3.1.	Preparación de cultivos	36
IV.3.2.	Preparación de subcultivos para células CNh	37
IV.3.3.	Preparación de subcultivos para células SAOS-2	38
IV.3.4.	Cuantificación de células	39
IV.4.	ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR	39
IV.5.	ENSAYO DE LIBERACIÓN DE IONES COBRE	41
CAPÍTULO V:	RESULTADOS Y DISCUSIONES	44
V.1.	ALGINATO	44
V.1.1.	Estudio de Viabilidad Celular con células CNh	44
V.1.1.1.	Influencia de ion entrecruzante	44
V.1.1.2.	Influencia de iones cobre	46
V.1.1.3.	Influencia de la geometría de nanocompósito en la adherencia celular	52
V.1.2.	Estudio de Viabilidad Celular con células SAOS-2	55
V.1.3.	Comparación de Estudio de Viabilidad Celular	57
V.1.4.	Estudio de Liberación de iones cobre	58
V.2.	ALGINATO SECO	60
V.2.1.	Estudio de Viabilidad Celular con células SAOS-2	60
V.2.2.	Estudio de Liberación de Iones Cobre	61
V.3.	TEGMA/BISGMA	63
V.3.1.	Estudio de Viabilidad Celular con células CNh	63
V.3.2.	Estudio de Liberación de Iones Cobre	65
V.4.	POLIPROPILENO	67
V.4.1.	Estudio de Viabilidad Celular con células SAOS-2	67
V.4.2.	Estudio de Liberación de Iones Cobre	70
V.5.	NANOPARTÍCULAS DE COBRE	71
V.5.1.	Estudio de Liberación de Iones Cobre	72
V.5.2.	Comparación de Liberación Normalizada de Iones Cobre	73
CAPÍTULO VI:	CONCLUSIONES	80
CAPÍTULO VII:	BIBLIOGRAFÍA	82
CAPÍTULO VIII:	ANEXOS	87
VIII.1.	ALGINATO	87
VIII.1.1.	Preparación de Nanocompósitos de Alginato	87
VIII.1.2.	Estudio de Viabilidad Celular con células CNh	88
VIII.1.2.1.	Influencia de ion entrecruzante	88
VIII.1.2.2.	Influencia de iones cobre	88
VIII.1.2.3.	Influencia de la geometría de nanocompósito en la adherencia celular	91
VIII.1.3.	Estudio de Viabilidad Celular con células SAOS-2	92
VIII.1.4.	Estudio de Liberación de Iones Cobre	94

VIII.2. ALGINATO SECO	95
VIII.2.1. Estudio de Viabilidad Celular con células SAOS-2	95
VIII.2.2. Estudio de Liberación de Iones Cobre	96
VIII.3. TEGMA/BISGMA	97
VIII.3.1. Preparación de Nanocompuestos de TEGMA/BisGMA	97
VIII.3.2. Estudio de Viabilidad Celular con células CNh	98
VIII.3.3. Estudio de Liberación de Iones Cobre	99
VIII.4. POLIPROPILENO	100
VIII.4.1. Estudio de Viabilidad Celular con células SAOS-2	100
VIII.4.2. Estudio de Liberación de Iones Cobre	102
VIII.5. NANOPARTÍCULAS DE COBRE	102
VIII.5.1. Estudio de Liberación de Iones Cobre	103
VIII.5.2. Comparación de Liberación de Iones Cobre	103

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura III.1: El camino desde la ciencia básica de biomateriales, a un dispositivo médico, a la aplicación clínica [4].</i>	7
<i>Figura III.2: Tasa de transformación de nanopartículas y micropartículas de cobre en agua destilada [15].</i>	10
<i>Figura III.3: Citotoxicidad asociada al cobre en las células HepG2 mediante el ensayo MTT [24].</i>	13
<i>Figura III.4: Estudio de citotoxicidad de CuHA y TiHA sobre células óseas (osteoblastos) mediante el ensayo MTT [25].</i>	14
<i>Figura III.5: Efecto de SCuNPs y iones Cu⁺² en viabilidad celular para células 3T3L1 mediante el ensayo MTT [26].</i>	14
<i>Figura III.6: Sectores donde se presentan infecciones intrahospitalarias [14].</i>	16
<i>Figura III.7: Ensayo de adherencia bacteria a láminas de cobre y acero inoxidable [7].</i>	16
<i>Figura III.8: Estudio in vitro de proliferación de células endoteliales con fármacos VEGF y FGF-2 solos (líneas a trazos) y complejos con cobre (líneas continuas) [29].</i>	17
<i>Figura III.9: Área de superficie ocupada por microvasos tras estimulación con diferentes concentraciones de FGF-2 [29].</i>	18
<i>Figura III.10: Estimulación de microvasos a partir de soportes con incorporación de cobre y de VEGF, solo y combinado [30].</i>	18
<i>Figura III.11: Comparación del porcentaje de inhibición del edema del Diflunisal solo y combinado con sulfato de cobre [31].</i>	19
<i>Figura III.12: Actividad celular cultivada en brushita cargada con diferentes concentraciones de Cu (II) durante 10 días [33].</i>	20
<i>Figura III.13: Actividad de nanopartículas de cobre combinado con ácido hialurónico para la regeneración de elastina [34].</i>	21
<i>Figura III.14: Efecto de la concentración de nanopartículas de cobre en la matriz de polipropileno sobre el tiempo requerido para matar el 50% de Escherichia coli [35].</i>	22

<i>Figura III.15: Monómeros que conforman la estructura de alginato [42].</i>	24
<i>Figura III.16: Estructura química de bloque G, bloque M y bloque alternado de alginato, respectivamente [39].</i>	24
<i>Figura III.17: Entrecruzamiento de alginato con iones calcio [42] [45].</i>	25
<i>Figura III.18: Perfiles de concentración de disolvente (grado de hinchamiento) y de concentración de soluto (porcentaje de soluto) [48].</i>	26
<i>Figura III.19: Componentes del copolímero TEGMA/BisGMA [51].</i>	27
<i>Figura III.20: Evolución de una línea celular [56].</i>	29
<i>Figura III.21: Influencia del Ca⁺² en la muerte celular.</i>	30
<i>Figura IV.1: Reducción del MTT al Formazán.</i>	40
<i>Figura IV.2: Esquema del ensayo MTT realizado en incubación a 37°C, 5% CO₂.</i>	40

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla III.1: Polímeros utilizados en el área de la medicina [9] [10] [11].</i>	8
<i>Tabla III.2: Efecto inhibitor de nanopartículas de cobre en la matriz de poliestireno. Zona Media diámetro de inhibición [mm]; (a) desviación estándar; (b) promedio diámetro [37].</i>	23
<i>Tabla IV.1: Composición del Medio de Cultivo sin suero.</i>	34
<i>Tabla IV.2: Composición del Medio de Cultivo con suero para CNh.</i>	34
<i>Tabla IV.3: Composición del Medio de Cultivo con suero para SAOS-2.</i>	35
<i>Tabla IV.4: Composición de la Solución D.</i>	35
<i>Tabla IV.5: Composición de la Tripsina 0,2%.</i>	36
<i>Tabla VIII.1: Preparación de solución de alginato con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre.</i>	87
<i>Tabla VIII.2: Preparación de solución entrecruzante para gelificación de solución de alginato.</i>	87
<i>Tabla VIII.3: Viabilidad celular con esferas de alginato para células CNh según medio entrecruzante.</i>	88
<i>Tabla VIII.4: Análisis estadístico Tukey para esferas de alginato para células CNh según medio entrecruzante.</i>	88
<i>Tabla VIII.5: Viabilidad celular con esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh.</i>	89
<i>Tabla VIII.6: Comparación de absorbancias con esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh.</i>	89
<i>Tabla VIII.7: Análisis estadístico Tukey para esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh.</i>	90
<i>Tabla VIII.8: Análisis estadístico Tukey para esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sin células CNh.</i>	90
<i>Tabla VIII.9: Viabilidad celular con discos de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh.</i>	91

<i>Tabla VIII.10: Comparación de absorbancias con discos de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh.</i>	<i>92</i>
<i>Tabla VIII.11: Análisis estadístico Tukey para discos de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh.</i>	<i>92</i>
<i>Tabla VIII.12: Análisis estadístico Tukey para discos de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sin células CNh.</i>	<i>92</i>
<i>Tabla VIII.13: Viabilidad celular con esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2.</i>	<i>93</i>
<i>Tabla VIII.14: Comparación de absorbancias con esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2.</i>	<i>93</i>
<i>Tabla VIII.15: Análisis estadístico Tukey para esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2.</i>	<i>94</i>
<i>Tabla VIII.16: Análisis estadístico Tukey para esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sin células SAOS-2.</i>	<i>94</i>
<i>Tabla VIII.17: Lixiviación de iones cobre [mg/L] desde esferas de alginato con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].</i>	<i>94</i>
<i>Tabla VIII.18: Tasa de liberación de iones cobre [mg/L.g de NPCu.hr] desde esferas de alginato con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].</i>	<i>95</i>
<i>Tabla VIII.19: Viabilidad celular con alginato seco a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2.</i>	<i>95</i>
<i>Tabla VIII.20: Comparación de absorbancias con alginato seco a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2.</i>	<i>96</i>
<i>Tabla VIII.21: Análisis estadístico Tukey para alginato seco a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2.</i>	<i>96</i>
<i>Tabla VIII.22: Análisis estadístico Tukey para alginato seco a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sin células SAOS-2.</i>	<i>96</i>
<i>Tabla VIII.23: Lixiviación de iones cobre [mg/L] desde alginato seco con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].</i>	<i>97</i>
<i>Tabla VIII.24: Tasa de liberación de iones cobre [mg/L.g de NPCu.hr] desde alginato seco con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].</i>	<i>97</i>
<i>Tabla VIII.25: Preparación de solución TEGMA/BisGMA con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre.</i>	<i>98</i>
<i>Tabla VIII.26: Viabilidad celular con discos de TEGMA/BisGMA a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh.</i>	<i>98</i>
<i>Tabla VIII.27: Comparación de absorbancias con discos de TEGMA/BisGMA a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh.</i>	<i>99</i>
<i>Tabla VIII.28: Análisis estadístico Tukey discos de TEGMA/BisGMA a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh.</i>	<i>99</i>
<i>Tabla VIII.29: Análisis estadístico Tukey discos de TEGMA/BisGMA a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sin células CNh.</i>	<i>99</i>

<i>Tabla VIII.30: Lixiviación de iones cobre [mg/L] desde TEGMA/BisGMA con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].</i>	100
<i>Tabla VIII.31: Tasa de liberación de iones cobre [mg/L.g de NPCu.hr] desde TEGMA/BisGMA con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].</i>	100
<i>Tabla VIII.32: Viabilidad celular con discos de polipropileno a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2.</i>	101
<i>Tabla VIII.33: Comparación de absorbancias con discos de polipropileno a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2.</i>	101
<i>Tabla VIII.34: Análisis estadístico Tukey discos de polipropileno a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2.</i>	101
<i>Tabla VIII.35: Análisis estadístico Tukey discos de polipropileno a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sin células SAOS-2.</i>	101
<i>Tabla VIII.36: Lixiviación de iones cobre [mg/L] desde polipropileno con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].</i>	102
<i>Tabla VIII.37: Tasa de liberación de iones cobre [mg/L.g de NPCu.hr] desde polipropileno con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].</i>	102
<i>Tabla VIII.38: Lixiviación de iones cobre [mg/L] desde nanopartículas de cobre directamente sumergidas en agua desionizada durante 96 [hr].</i>	103
<i>Tabla VIII.39: Tasa de liberación de iones cobre [mg/L.g de NPCu.hr] desde nanopartículas de cobre directamente sumergidas en agua desionizada durante 96 [hr].</i>	103
<i>Tabla VIII.40: Lixiviación de iones cobre [mg/L.g de NPCu] desde esferas de alginato con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].</i>	104
<i>Tabla VIII.41: Lixiviación de iones cobre [mg/L.g de NPCu] desde alginato seco con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].</i>	104
<i>Tabla VIII.42: Lixiviación de iones cobre [mg/L.g de NPCu] desde TEGMA/BisGMA con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].</i>	104
<i>Tabla VIII.43: Lixiviación de iones cobre [mg/L.g de NPCu] desde polipropileno con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].</i>	105
<i>Tabla VIII.44: Lixiviación de iones cobre [mg/L.g de NPCu] desde nanopartículas de cobre directamente sumergidas en agua desionizada durante 96 [hr].</i>	105
<i>Tabla VIII.45: Efecto de nanopartículas de cobre en matriz de alginato húmedo sobre liberación normalizada de iones cobre a las 24 horas.</i>	105
<i>Tabla VIII.46: Efecto de nanopartículas de cobre en matriz de alginato seco sobre liberación normalizada de iones cobre a las 24 horas.</i>	106

<i>Tabla VIII.47: Efecto de nanopartículas de cobre en matriz de TEGMA/BisGMA sobre liberación normalizada de iones cobre a las 24 horas.</i>	106
<i>Tabla VIII.48: Efecto de nanopartículas de cobre en matriz de polipropileno sobre liberación normalizada de iones cobre a las 24 horas.</i>	106
<i>Tabla VIII.49: Efecto de nanopartículas de cobre sumergidas en agua desionizada sobre liberación normalizada de iones cobre a las 24 horas.</i>	106
<i>Tabla VIII.50: Variación de diámetro de esferas de alginato con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sumergidas en agua desionizada durante 96 [hr].</i>	107
<i>Tabla VIII.51: Variación de pesos de esferas de alginato con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sumergidas en agua desionizada durante 96 [hr].</i>	107

ÍNDICE DE GRÁFICOS

<i>Gráfico V.1: Viabilidad celular por MTT con esferas de alginato para células CNh según medio entrecruzante, solución al 20 [mM]. Datos: Promedio y Desviación Estándar, n=8; (■): valor $p < 0.01$ comparado con el control, utilizando Test de Tukey.</i>	45
<i>Gráfico V.2: Viabilidad celular por MTT con esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh; (*): Compósito de alginato al 2%. Datos: Promedio y Desviación Estándar, n=6; (■): valor $p < 0.01$ comparado con el control, utilizando Test de Tukey; (◆): valor $p < 0.01$ comparado con el alginato blanco, utilizando Test de Tukey.</i>	47
<i>Gráfico V.3: Comparación de absorbancias con esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh; (*): Compósito de alginato al 2%. Datos: Promedio y Desviación Estándar, n=6; (■): valor $p < 0.01$ comparado con el control para muestras con y sin células, utilizando Test de Tukey; (◆): valor $p < 0.01$ comparado con el alginato blanco para muestras con células, utilizando Test de Tukey; (▲): valor $p < 0.01$ comparado con el alginato blanco para muestras sin células, utilizando Test de Tukey; (—): valor $p < 0.05$ comparado con el alginato blanco para muestras sin células, utilizando Test de Tukey.</i>	49
<i>Gráfico V.4: Viabilidad celular por MTT corregida con esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh; (*): Compósito de alginato al 2%.</i>	51
<i>Gráfico V.5: Viabilidad celular por MTT corregida con discos de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh; (*): Compósito de alginato al 2%.</i>	53
<i>Gráfico V.6: Comparación de viabilidad celular por MTT corregida de alginato con diferentes geometrías y concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh; (*): Compósito de alginato al 2%.</i>	54
<i>Gráfico V.7: Viabilidad celular por MTT corregida con esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2; (*): Compósito de alginato al 2%.</i>	56

Gráfico V.8: Comparación de viabilidad celular por MTT corregida de alginato con nanopartículas de cobre para células CNh y SAOS-2; (*): Compósito de alginato al 2%.	57
Gráfico V.9: Lixiviación corregida de iones cobre [mg/L] desde esferas de alginato con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr]; (*): Compósito de alginato al 2%.	58
Gráfico V.10: Tasa de liberación corregida de iones cobre [mg/L.g de NPCu.hr] desde esferas de alginato con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr]; (*): Compósito de alginato al 2%.	59
Gráfico V.11: Viabilidad celular por MTT corregida con esferas de alginato seco a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2; (*): Compósito de alginato seco al 2%.	61
Gráfico V.12: Lixiviación corregida de iones cobre [mg/L] desde alginato seco con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr]; (*): Compósito de alginato seco al 2%.	62
Gráfico V.13: Tasa de liberación corregida de iones cobre [mg/L.g de NPCu.hr] desde alginato seco con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr]; (*): Compósito de alginato seco al 2%.	63
Gráfico V.14: Viabilidad celular por MTT corregida con discos de TEGMA/BisGMA a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh; (*): Compósito de TEGMA/BisGMA.	65
Gráfico V.15: Lixiviación corregida de iones cobre [mg/L] desde TEGMA/BisGMA con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr]; (*): Compósito de TEGMA/BisGMA.	66
Gráfico V.16: Tasa de liberación corregida de iones cobre [mg/L.g de NPCu.hr] desde TEGMA/BisGMA con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr]; (*): Compósito de TEGMA/BisGMA.	67
Gráfico V.17: Viabilidad celular por MTT con discos de polipropileno a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh; (*) Compósito de polipropileno. Datos: Promedio y Desviación Estándar, n=6; (■): valor $p < 0.01$ comparado con el control, utilizando Test de Tukey; (◆): valor $p < 0.01$ comparado con el polipropileno blanco, utilizando Test de Tukey; (▲): valor $p < 0.05$ comparado con el polipropileno blanco, utilizando Test de Tukey.	68
Gráfico V.18: Comparación de absorbancias con discos de polipropileno a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2; (*) Compósito de polipropileno. Datos: Promedio y Desviación Estándar, n=6; (■): valor $p < 0.01$ comparado con el control para muestras con y sin células, utilizando Test de Tukey; (◆): valor $p < 0.01$ comparado con el polipropileno blanco para muestras con células, utilizando Test de Tukey; (▲): valor $p < 0.05$ comparado con el polipropileno blanco para muestras con células, utilizando Test de Tukey.	69

Gráfico V.19: Lixiviación corregida de iones cobre [mg/L] desde polipropileno con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr]; (*) Compósito de polipropileno.	70
Gráfico V.20: Tasa de liberación corregida de iones cobre [mg/L.g de NPCu.hr] desde polipropileno con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr]; (*) Compósito de polipropileno.	71
Gráfico V.21: Lixiviación de iones cobre [mg/L] desde nanopartículas de cobre directamente sumergidas en agua desionizada durante 96 [hr].	72
Gráfico V.22: Tasa de liberación de iones cobre [mg/L.g de NPCu.hr] desde nanopartículas de cobre directamente sumergidas en agua desionizada durante 96 [hr].	73
Gráfico V.23: Comparación de lixiviación normalizada de iones cobre durante 96 horas, para todos los nanocompósitos estudiados.	74
Gráfico V.24: Efecto de nanopartículas de cobre en matriz de alginato húmedo/seco sobre liberación normalizada de iones cobre a las 24 horas.	76
Gráfico V.25: Efecto de nanopartículas de cobre en matriz de polipropileno y nanopartículas de cobre sumergidas en agua desionizada sobre liberación normalizada de iones cobre a las 24 horas.	76
Gráfico V.26: Variación de diámetros de esferas de hidrogel de alginato con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sumergidas en agua desionizada durante 96 horas; (*): Compósito de alginato al 2%.	77
Gráfico V.27: Variación de peso de esferas de alginato seco con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sumergidas en medio de cultivo sin suero durante 96 horas; (*): Compósito de alginato seco al 2%.	78

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

I.1. ANTECEDENTES GENERALES

Grandes avances se han observado en la ingeniería biomédica en años recientes, destacando el uso de biomateriales en implantes y prótesis, lo que los convierte en insumos indispensables para el desarrollo de la medicina. En este sentido, los biomateriales son usados para reemplazar o reparar físicamente un tejido dañado, blando o duro. Así, los biomateriales son usados como dispositivos médicos destinados a interactuar con sistemas biológicos. De manera adicional, se debe tener en cuenta que no cualquier material puede ser utilizado como biomaterial. Para que esto suceda, este debe cumplir una importante característica: ser biocompatible. Esto significa que el cuerpo del paciente debe aceptar dicho material, sin que se presente irritación de tejidos, respuesta inflamatoria y/o reacciones alérgicas.

No obstante, se debe mencionar que las infecciones nosocomiales producto de la utilización de implantes representan actualmente cerca del 45% del total de infecciones intrahospitalarias.

Dentro de los biomateriales utilizados durante los últimos años, se puede destacar la utilización de polímeros, con los cuales se pueden crear nanocompósitos formados por una matriz de carácter continuo, y una fase discontinua, constituida por un relleno nanométrico disperso que se incrusta en la matriz.

Algunas matrices poliméricas utilizadas últimamente en el área de la medicina y sujetas a constante análisis adicional de sus potencialidades, son el alginato y el TEGMA/BisGMA. El primero es un hidrogel de carácter hidrofílico, utilizado en la cicatrización de heridas, la administración de fármacos y aplicaciones de ingeniería de tejidos; y el segundo es ampliamente utilizado en la restauración directa de piezas dentales anteriores y posteriores.

En tanto, los rellenos de dichos compósitos pueden ser variados, dentro de los cuales se pueden destacar metales. Entre estos, se encuentra el cobre, que ha sido utilizado desde hace muchos años como conductor eléctrico, pero que presenta otras potencialidades. En efecto, con los años se han podido estudiar otras funciones y aplicaciones para el cobre, dentro de las cuales destacan su capacidad como nutriente esencial para el ser humano en trazas. Además, es un agente biocida (bactericida), ya sea en superficies o implementos para diferentes usos en centros de salud. Adicionalmente, el metal ha mostrado propiedades en la regeneración de tejidos endoteliales y óseos.

I.2. MOTIVACIÓN DEL PROYECTO

El desarrollo tecnológico y la ciencia biomédica, buscan de manera creciente la consolidación de tratamientos mínimamente invasivos y altamente eficientes. En este contexto, parte de la investigación científica asociada al desarrollo e implementación de prótesis, tiene por objetivo minimizar los riesgos de infección generadas por las mismas, que en la actualidad representan 45% del total de infecciones intrahospitalarias.

Para esto, la tendencia se asocia al reforzamiento de biomateriales ya existentes, mediante la incorporación de componentes con atributos que reduzcan los riesgos de infección y favorezcan la regeneración de tejidos. En este contexto, el cobre ha ganado espacio como material complementario a polímeros ya utilizados en el área médica, tales como polipropileno, poliestireno, entre otros, a través de la generación de nanocompósitos. En efecto, se estima que estos u otros polímeros aun no incorporados a la práctica biomédica, podrían verse beneficiados de los atributos no explotados que se han descubierto para el cobre, entre los que se cuentan: (i) regeneración ósea, (ii) capacidad angiogénica, (iii) características antiinflamatorias, (iv) facultades antimicrobianas, entre otras.

En base a lo anterior, esto es, (i) la alta tasa de infecciones intrahospitalarias producto de implantes, (ii) la potencial capacidad antimicrobiana y regenerativa del cobre, y (iii) el creciente desarrollo de nanocompósitos para su uso como biomateriales, en este proyecto se abordó el desafío de diseñar compósitos poliméricos que incorporen nanopartículas de cobre, con uso posible en el área de la medicina.

Otra motivación para este trabajo estuvo asociada a incorporar al análisis ciertos polímeros que en la actualidad son utilizados en la confección de implantes y que en esta investigación son potenciados con cobre. De forma complementaria, este estudio innova en la experimentación de compuestos poliméricos cuyo uso aun no ha sido extendido al área de implantes y prótesis, menos aún en combinación con el mencionado metal.

I.3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

Este proyecto se basó principalmente en la realización de nanocompósitos poliméricos. Se diseñaron muestras de matrices poliméricas con incorporación de nanopartículas de cobre comerciales de 5 [nm]. La elaboración de estos nanocompósito se llevó a cabo en diversos laboratorios, tales como el Laboratorio de Terapia Celular (Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM) de la Facultad de Medicina; y el Laboratorio Nanomateriales de la Facultad de Odontología, todos pertenecientes a la Universidad de Chile.

Se subcultivaron células sobre los nanocompuestos con el objetivo de evaluar su toxicidad. Para realizar la evaluación antes descrita, se utilizó el método MTT, en donde se midió la viabilidad celular de las líneas celulares CNh y SAOS-2 en presencia de dichos nanocompuestos.

Las pruebas de citotoxicidad fueron realizadas a nivel de laboratorio, por lo tanto se trabajó de forma *in vitro*, con la finalidad de tener una primera aproximación sobre el efecto de la liberación de iones cobre de dichos nanocompuestos sobre las líneas celulares nombradas en el párrafo anterior.

En forma paralela, se estudió la lixiviación de cada nanocompuesto preparado de tal forma de realizar una comparación entre las matrices poliméricas y la viabilidad celular que presente cada una de éstas. Dichos ensayos fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Ingeniería de Polímeros de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, perteneciente a la Universidad de Chile.

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

II.1. OBJETIVO GENERAL

Preparar compósitos poliméricos con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre y determinar el efecto de las nanopartículas sobre la viabilidad celular en contacto con células.

II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Elaborar compósitos poliméricos de alginato y de copolímero TEGMA/BisGMA, con distintas concentraciones de nanopartículas de cobre.
- ✓ Estudiar el comportamiento citotóxico de los diferentes compósitos poliméricos generados mediante ensayos de MTT, en líneas celulares CNh y SAOS-2.
- ✓ Estudiar la liberación de iones cobre desde los diferentes nanocompósitos poliméricos mediante el método de lixiviación y realizar una comparación entre éstos.
- ✓ Relacionar los resultados de lixiviación y citotoxicidad de los nanocompósitos poliméricos analizados.

CAPÍTULO III: ANTECEDENTES

La ingeniería biomédica ha avanzado considerablemente en las últimas décadas, generando importantes avances tecnológicos entre los que se destaca la creación de biomateriales, los cuales son utilizados ampliamente en el área de la medicina, en especial como parte de prótesis e implantes, llegando a convertirse en un material indispensable para diversos campos de la ciencia médica, tales como [1][2]:

- ✓ Medicina Intravascular: En la elaboración de catéteres utilizados para drenajes.
- ✓ Medicina Cardiovascular: En injertos vasculares, corazón, válvulas de corazón, marcapasos, dispositivos de asistencia ventricular (VAD), entre otros.
- ✓ Medicina Respiratoria: En laringe, tráquea, diafragma, pulmones, caja torácica, entre otros.
- ✓ Ortopedia: Implantes ortopédicos biocompatibles, por ejemplo, para reparación de huesos, tendones, cartílagos y articulaciones.
- ✓ Ginecología: En implantes mamarios.
- ✓ Oftalmología: En lentes intraoculares, lentes de contacto e implantes de retina.
- ✓ Odontología: En materiales dentales para implantes, prótesis fijas o removibles y puentes fijos para mantener la función, salud y estética bucal y dental.
- ✓ Tejidos: Rehabilitación de tejidos y órganos, disciplina también conocida como ingeniería de tejidos blandos, que ya ha producido piel artificial para injertos en casos de quemaduras graves.

De esta manera, los biomateriales son utilizados para reemplazar físicamente un tejido, ya sea blando o duro, que ha sido dañado o destruido, con el fin de reparar o reconstruirlo, es decir, los biomateriales son usados como dispositivos médicos destinados a interactuar con sistemas biológicos [2][3].

En función con lo anterior, se debe tener en cuenta que no cualquier material puede ser utilizado como biomaterial, pues para esto es necesario que el insumo cumpla con la característica de ser biocompatible, esto es, debe ser aceptado por el cuerpo del paciente, evitando la irritación de los tejidos, respuestas inflamatorias y/o

reacciones alérgicas [3]. De igual forma, los materiales no deben ser tóxicos y deben cumplir funciones estructurales y de mejoramiento de la calidad de vida [4].

En esta línea, Gristina en 1987 postuló que los biomateriales presentan una desventaja importante, que corresponde a alta adherencia de bacterias al biomaterial que se quiera implantar, siendo susceptibles a colonizaciones bacterianas y capaces de favorecer la aparición de posibles infecciones, las que pueden traer graves consecuencias para los pacientes llegando a causar la muerte [5].

En efecto, es importante señalar que las infecciones nosocomiales producto de la utilización de implantes, representan actualmente cerca del 45% de todas las infecciones intrahospitalarias [1].

En Chile se notifican anualmente alrededor de 70.000 casos de infección nosocomial y se estima que cada uno prolonga la estadía hospitalaria, por 10 días en promedio, lo que se traduce en 700.000 días cama y un costo de US\$ 70 millones para el país [6]. Las infecciones intrahospitalarias (IIH) detectadas en el sistema de salud, se asocian frecuentemente a [7]:

- ✓ Infecciones del tracto urinario, asociadas al uso de catéter urinario permanente y que representan el 23% del total de IIH, teniendo una incidencia de 3% de pacientes conectados a esta sonda. Los principales agentes causales de este tipo de infecciones son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*.
- ✓ Infecciones de heridas operatorias, cuya frecuencia depende del tipo de intervención quirúrgica, por ejemplo infecciones tras operaciones de vesícula biliar, existen 1% y 0,3% en cirugías clásicas y laparoscópicas, respectivamente. En *by-pass* coronarios las infecciones aumentan a un 3%. Los principales agentes causales son *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
- ✓ Neumonías originadas por ventilación mecánica, que presentan alto nivel de mortalidad, especialmente en pacientes adultos. En pacientes con patología de base alcanza al 12,1%. La incidencia es de 14,5% y 3% en caso de adultos y niños, respectivamente. Las bacterias responsables de estas infecciones son *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.
- ✓ Septicemias, que corresponden a infecciones sistémicas e invaden la circulación sanguínea. La incidencia de septicemia es de 1,4% y 2% de pacientes adultos y pediátricos, respectivamente. Mientras que, la letalidad

alcanza el 13,3%. Los principales agentes patógenos son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativa* y *Klebsiella pneumoniae*.

Cabe destacar que debido a las IIH aumenta el uso de antibióticos, en donde el empleo de estos por heridas operatorias puede llegar a ser entre 13 y 113 dosis diarias. Mientras que en neumonías asociadas a ventilación mecánica, el uso aumentaría entre 28 y 73 dosis diarias [7].

Como consecuencia de lo anterior, los avances tecnológicos en el campo de los biomateriales han estado orientados a un diseño y composición de los mismos, que permitan disminuir el contenido de cargas bacterianas, de tal forma de reducir la probabilidad de rechazo por el cuerpo de los pacientes. De esta manera, se han incorporado varias etapas en este proceso, entre las cuales se destacan la investigación inicial, el diseño, estudios preclínicos y clínicos, según se muestra en la Figura III.1.

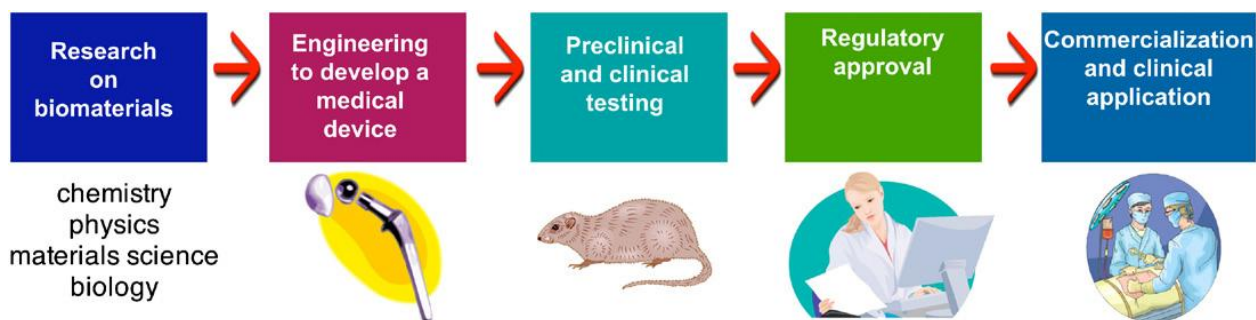


Figura III.1: El camino desde la ciencia básica de biomateriales, a un dispositivo médico, a la aplicación clínica [4].

Lo anterior es común a todos los biomateriales utilizados como insumo de prótesis e implantes modernos, los cuales incluyen materiales de diverso origen y características, entre los que destacan metales, polímeros y materiales cerámicos, como por ejemplo titanio o aleación de cobalto-cromo, utilizados para reemplazar o reforzar articulaciones de cadera, o bien polímeros de polimetacrilato de metilo, usados para lentes intraoculares e interactuando directamente con estructuras y órganos del cuerpo humano [8].

III.1. POLÍMEROS COMO MATRIZ

La utilización de polímeros como biomaterial para prótesis e implantes es de larga data en la ciencia médica. No obstante esto, en años recientes han habido crecientes avances en el uso de polímeros – como biomaterial principal – en los que se ha intentado incorporar nuevos elementos que pueden aportar potencialidades aun no aprovechadas en el campo de la salud.

Como se ha mencionado anteriormente, lo relevante en el uso de polímeros – ya sea como matriz o aisladamente – como biomaterial para aplicaciones médicas, es que cuenten con la característica de biocompatibilidad, de manera tal de reducir los riesgos de rechazo de organismos biológicos.

Así por ejemplo, en el campo de la medicina reconstructiva, diversos han sido los polímeros incorporados como materia prima para elaboración de prótesis e implantes, entre los que se destacan aquellos mostrados en la Tabla III.1.

Tabla III.1: Polímeros utilizados en el área de la medicina [9][10][11].

Polímero (*)	Aplicación
Poliéster	Ingeniería de tejidos
Polianhídrido	Ingeniería de tejidos
Poliglicolida	Ingeniería de tejidos
Polilactida	Ingeniería de tejidos
Polifosfaceno	Ingeniería de tejidos
Policarbonato	Ingeniería de tejidos
Poliuretano	Prótesis e Ingeniería de tejidos de huesos
Polipropileno	Ingeniería de tejidos, ortopédico

() Cumplimiento de la biocompatibilidad*

Por su parte, desde la perspectiva antimicrobiana, existen 4 tipos de polímeros que actúan como agente biocida: (i) los polímeros que exhiben actividad antimicrobiana por sí mismos, (ii) aquellos cuya actividad bactericida se confiere mediante una modificación química, (iii) los polímeros a los que se les incorporan agentes antimicrobianos orgánicos, y (iv) aquellos a los que se les incorporan agentes antimicrobianos inorgánicos, siendo los dos últimos los más estudiados en años recientes [12].

En esta línea, y con el fin de optimizar las propiedades de los polímeros o bien adicionarle atributos, han ganado creciente importancia los llamados compósitos poliméricos, los cuales consisten en dos o más fases química y físicamente separadas por una interface, que resultan en un sistema con mayores y mejores propiedades estructurales o funcionales.

En efecto, la generación de compósitos permite superar en versatilidad a sus polímeros utilizados como matriz, por cuanto al combinarse con otros materiales pueden agregar nuevos atributos que permiten un mejor desempeño en campos específicos de salud. Desde este punto de vista, al combinar polímeros con ciertos metales u otros elementos es posible desarrollar biomateriales con aptitudes regenerativas, antiinflamatorias y bactericidas, entre otras, o bien, potenciar aquellas

facultades ya presentes en el polímero, por lo tanto la utilización de compósitos permite una mayor efectividad en el tratamiento, al ser desarrollado casi a la medida de los requerimientos del paciente. Por otro lado, la generación de nanocompósitos permite un mayor control de las propiedades indeseadas de algunos materiales, ya sean compuestos orgánicos o inorgánicos, los cuales en aplicación directa con organismos biológicos podrían llegar a ser altamente tóxicos, en determinadas concentraciones.

Las fases en la generación de compósitos poliméricos consisten en una matriz o fase primaria, de carácter continuo, y una fase dispersa o secundaria, que está incrustada en la matriz en una forma discontinua y como relleno. Este relleno disperso de los compósitos puede ser de cualquier tamaño. Sin embargo, aquellos compósitos que poseen rellenos nanométricos cuentan con un mayor contacto interfacial entre polímero y relleno, lo que aumenta o mejora las propiedades adquiridas del compuesto. Este tipo de compósitos se denomina nanocompósito polimérico [13].

Los nanocompósitos han ganado relevancia en el último tiempo porque dado su tamaño de partícula de relleno, permiten generar combinaciones más estables desde el punto de vista de liberación de partículas, lo que se traduce en menor toxicidad, al presentar un mayor control sobre las fases del compuesto, sacando mayor partido a sus atributos y evitando de manera más eficiente los efectos adversos sobre sistemas biológicos.

III.2. PROPIEDADES Y USOS DEL COBRE

El cobre es un metal que se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza y cuyo descubrimiento data de alrededor de 5.000 años AC. Sin embargo, en tiempos modernos el cobre ganó especial relevancia por su propiedad más importante, es decir, su capacidad como conductor eléctrico [14]. Por su parte, en años recientes se han desarrollado e investigado otras funcionalidades y aplicaciones para este metal.

En este ámbito, se ha descubierto que el cobre presenta una característica adicional importante que se asocia a su capacidad de corrosión la que puede ser favorable o desfavorable, dependiendo de la finalidad con que sea utilizado el metal. A este respecto, se puede destacar el trabajo realizado por Xia y cols. en 2006, quienes estudiaron la transformación de las nanopartículas y micropartículas de cobre en agua (ver Figura III.2), siendo la primera 100 veces más pequeña que la segunda. Adicionalmente, el estudio permitió determinar que mientras menor es el tamaño de la partícula de cobre, mayor es el área específica superficial (m^2/g), así la interacción entre las nanopartículas de cobre y el agua destilada es mucho más fácil y rápida. De igual forma, la investigación permitió establecer que la diferencia de transformación está relacionada con una película muy delgada de CuO , ya que ésta retarda la interacción

entre partículas de cobre y agua destilada, siendo esta película mayor para las partículas más grandes [15].

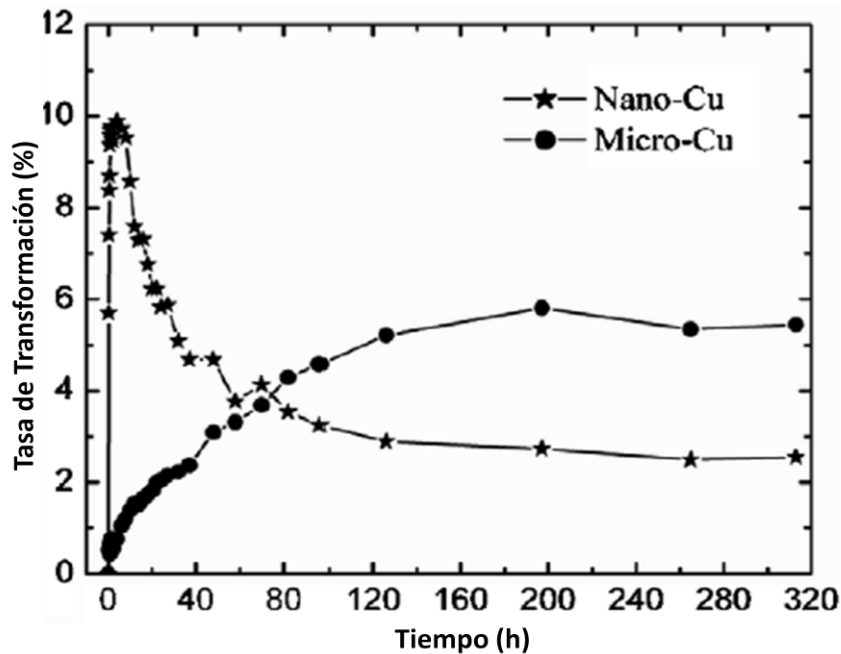


Figura III.2: Tasa de transformación de nanopartículas y micropartículas de cobre en agua destilada [15].

La característica corrosiva del cobre es de especial relevancia para esta investigación, en la cual el metal es utilizado como relleno para nanocompuestos poliméricos.

Como se señalara anteriormente, la generación de compósitos o nanocompuestos busca la potenciación cruzada de dos o más biomateriales con la finalidad de generar un beneficio a un organismo biológico, basado en los atributos de sus componentes. Desde este punto de vista, para aprovechar las propiedades con aplicación médica del cobre (varias de las cuales se detallan en la sección siguiente), es necesario contar con una liberación de iones del metal, lo cual es posible a partir de la característica de corrosión.

III.2.1. Funciones del Cobre

El cobre presenta diversas funcionalidades, las que van desde su característica de nutriente principal para el ser humano, hasta su participación como agente biocida, destacando su capacidad antimicrobiana y antiviral.

III.2.1.1. Nutriente Esencial

El cobre es un oligoelemento esencial para el organismo, estando presente en una cantidad total que varía entre 50 y 150 [mg] [16]. Por otro lado, la ingesta diaria recomendada de cobre es desde 1 a 3 [mg], de lo cual se absorbe sólo entre el 10% y 50%, la que además se puede ver disminuida por altas ingestas alimentarias de hierro, molibdeno y zinc [17]. Cabe destacar también, que el cobre actúa como cofactor necesario para muchas enzimas y proteínas, así como componente necesario para el desarrollo de los huesos y del tejido elástico, para el funcionamiento del sistema nervioso central y la síntesis de la hemoglobina [16][17].

La deficiencia de cobre en el organismo – denominada Síndrome de Menkes – se caracteriza por la falta de este metal en las células del intestino, pudiendo generar anemia, neutropenia, disminución de las capacidades inmunológicas, alteraciones del metabolismo del colesterol y la glucosa, así como desmineralización ósea [18][19].

De igual forma, la ingesta en exceso de cobre puede llegar a ser tóxica, debido a la gran capacidad de oxidación del metal. Esto conlleva al desarrollo de la denominada enfermedad de Wilson, que consiste en una alteración congénita que afecta al metabolismo del cobre y ocasiona su acumulación en diferentes tejidos, principalmente hígado, núcleos basales y córnea [16][17][18][20].

III.2.1.2. Agente Biocida

Además de ser un nutriente esencial, el cobre tiene una importante capacidad biocida, en particular en lo que dice relación con sus características antimicrobianas.

La capacidad biocida del cobre ha sido demostrada por diferentes estudios, entre los cuales se destaca la investigación realizada por Kuhn. En dicho trabajo se estudió el crecimiento bacterial en variados metales y con diferentes bacterias, descubriéndose que tanto la hojalata, como el cobre, eran los metales que mostraban menos proliferación bacteriana [21].

Noyce y cols. realizaron estudios similares en cuanto a comparación de diferentes metales, con tres tipos de cepas bacterianas, tras lo cual se logró demostrar el efecto antimicrobiano del cobre por sobre los demás metales [22].

También se han realizado estudios de la capacidad antimicrobiana del cobre como purificador del agua, entre los cuales se encuentran: (i) comparaciones con materiales de plomería, en donde el cobre sólo permitió la sobrevivencia de 1% de la bacteria *E. coli*, viable luego de cinco horas, (ii) estudios en superficies con cobre, vidrio y material de plomería, en donde la bacteria *L. pneumophila* disminuyó

significativamente sobre superficies de o con cobre, testeando simultáneamente agua a diferentes temperaturas, y (iii) análisis de complejos de cobre-plata en agua con presencia de la bacteria *L. pneumophila*, en donde la colonia de dicha bacteria disminuyó considerablemente a concentraciones mayores a 0,4 ppm y 0,04 ppm de cobre y plata, respectivamente [21].

Otros estudios han tenido como motivación el destacar la funcionalidad del cobre como antiviral para combatir el virus de la gripe y de inmunodeficiencia humana (VIH-1), que afectan a humanos. Por un lado, Sagripanti y Lightfoote realizaron estudios con este último virus, logrando observar una desactivación del 50% con concentraciones entre 0,16 y 1,6 mM del ion cobre [21]. Por su parte, investigaciones realizadas en la Universidad de Southampton demuestran que el cobre desactiva el virus de la gripe humana, lo cual podría motivar futuros estudios con el virus de la gripe aviar, cuyo comportamientos sería muy similar al de la gripe común [23].

III.2.2. Toxicidad del Cobre

Como en el caso de otros metales, la presencia excesiva de cobre también ha demostrado ser toxica, a ciertos niveles, para organismos celulares en general. Esto se debe a que, en presencia de agua y oxígeno, el cobre libera iones positivos y genera radicales hidroxilo, ambos altamente tóxicos. Además, los electrones producidos por las reacciones de oxidación interactúan con las moléculas de agua formando otros radicales hidroxilos [7][21].

Son múltiples las propiedades que permitirían explicar la toxicidad del cobre, entre las cuales se destacan [7][14][21]:

- ✓ La de inhibición o alteración de la síntesis de proteínas, con lo que impide que ellas efectúen procesos claves del metabolismo.
- ✓ La de alteración en la permeabilidad de la membrana celular, causando la peroxidación, induciendo daño oxidativo de los lípidos. A partir de esto, se crea un desbalance en la entrada y la salida de minerales – sodio y potasio – clave para su normal funcionamiento.
- ✓ La de destrucción o alteración de los ácidos nucleicos (DNA), causando la capacidad de multiplicarse.

Cualquiera de estas características atribuidas al cobre, aisladamente o en conjunto, impiden que las células desarrollen procesos claves para mantenerse vivos [14].

En esta línea, se han realizado estudios de citotoxicidad del cobre, analizando de esta manera el efecto sobre células, entre los cuales se puede mencionar el trabajo realizado por Seth y cols. quienes trabajaron con células Hep G2 incubadas con CuCl_2 durante 24 y 48 hrs., en intervalos de concentración de 50-100-150-200 μM . Los resultados obtenidos a partir de ensayos de MTT mostraron que en 24 hrs. se produjo un aumento de la toxicidad del Cu a bajas concentraciones, estabilizándose a medida que se aumentaban las concentraciones del metal. Al contrario, análisis realizados a las 48 hrs. permitieron observar un constante aumento en la toxicidad independiente de las concentraciones del cobre. Tras esto se determinó que el Cu producía un daño a nivel mitocondrial. Los resultados recién mencionados pueden observarse en la Figura III.3 [24].

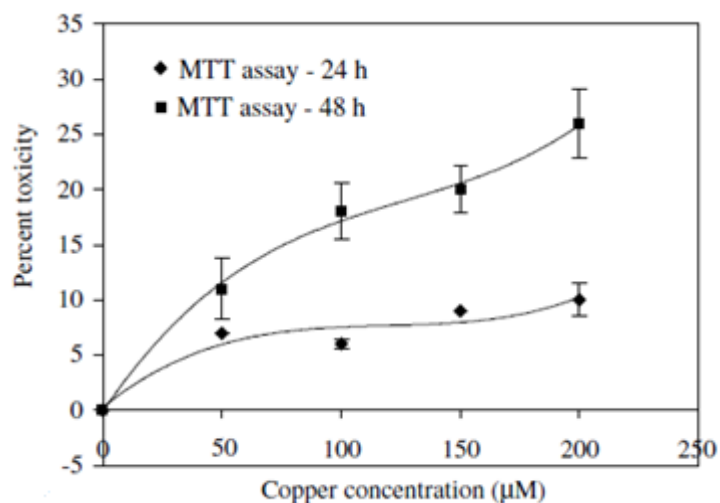


Figura III.3: Citotoxicidad asociada al cobre en las células HepG2 mediante el ensayo MTT [24].

Adicionalmente, se han llevado a cabo estudios de nanopartículas de hidroxiapatita (HA) sustituidas con cobre (II) y titanio (IV) (CuHA y TiHA , respectivamente) en diferentes relaciones molares respecto a la cantidad de calcio (0,01; 0,05, 0,10; 0,15). Los resultados obtenidos mostraron un efecto citotóxico sobre los osteoblastos para $\text{Cu}1$. Al contrario, para $\text{Ti}10$ no se observó una diferencia estadísticamente significativa respecto al HA puro. Tras esto, se determinó que la presencia de Cu^{+2} era citotóxica, mientras Ti^{+4} fue sólo ligeramente tóxico para los osteoblastos. A partir de esto, no es aconsejable la utilización de CuHA como revestimiento para implantes. Los resultados se pueden observar en la Figura III.4 [25].

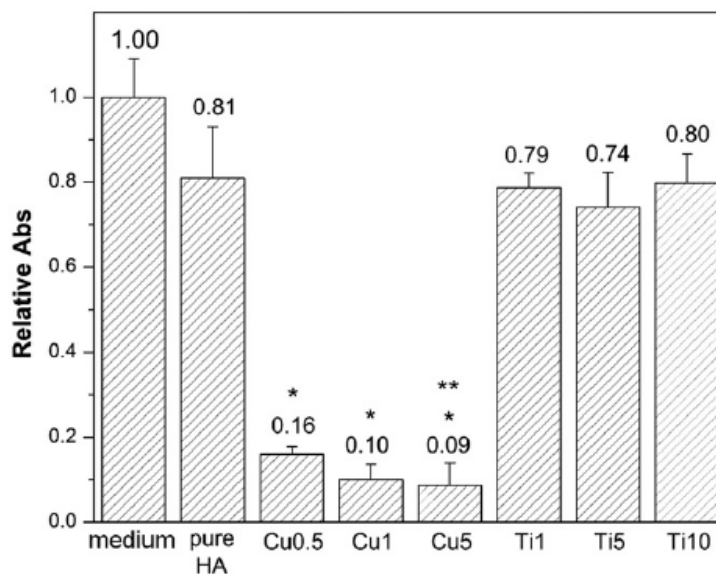


Figura III.4: Estudio de citotoxicidad de CuHA y TiHA sobre células óseas (osteoblastos) mediante el ensayo MTT [25].

Por otro lado, Valodkar y cols. evaluaron la toxicidad *in vitro* de nanopartículas de cobre con células de fibroblastos de embriones de ratón (3T3L1) mediante el ensayo de viabilidad celular MTT. Durante el estudio se observó que los iones Cu^{+2} son más citotóxicos que nanopartículas cubiertas (SCuNPs). Con lo cual se afirma la teoría de la liberación lenta de los iones cuando se encuentran en matriz. Los resultados se pueden observar en la Figura III.5 [26].

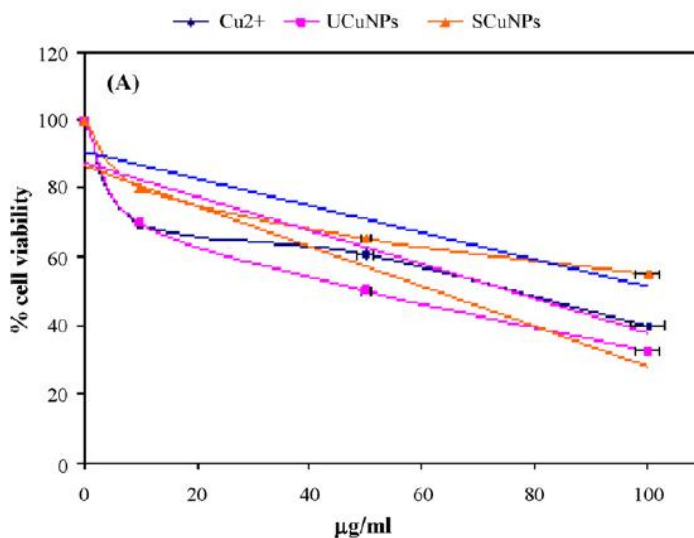


Figura III.5: Efecto de SCuNPs y iones Cu^{+2} en viabilidad celular para células 3T3L1 mediante el ensayo MTT [26].

III.2.3. Nuevas Aplicaciones del Cobre

Como se mencionó anteriormente, en los últimos años diversos estudios han buscado aplicaciones alternativas de iones metálicos en biomedicina, destacando los análisis realizados con cobre, zinc, calcio, cobalto, etc. Dichos estudios han estado orientados a los campos de la regeneración de tejidos, aplicaciones terapéuticas y – consecuentemente – el diseño de biomateriales con capacidad de liberación controlada de dichos iones. En este ámbito, se destacan estudios en el área intrahospitalaria, en la estimulación de células endoteliales, la búsqueda de propiedades antiinflamatorias, la inducción de la proliferación de células madres mesenquimales humanas como medio de diferencia hacia el linaje osteogénico, entre otras [27].

III.2.3.1. Infecciones Intrahospitalarias

Recientemente el uso del cobre ha concitado interés como insumo biomédico para combatir las infecciones intrahospitalarias (IIH). Entre los agentes causantes de estas infecciones, se encuentran aquellos mencionados al inicio de este capítulo, destacándose el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SAMR), la *Klebsiella pneumoniae*, el *Acinetobacter baumannii* y la *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros agentes patógenos [7] [14].

Como se mencionara, las enfermedades intrahospitalarias constituyen un problema bastante serio y frecuente en los recintos de salud de todo el mundo, cuyo control es complejo debido a las diversas zonas en que se pueden alojar las bacterias, elevando los costos del sistema y la mortalidad de los pacientes, en particular, por tratarse frecuentemente de cepas multiresistentes a antibióticos. La Figura III.6 presenta los ejemplos típicos de sectores donde se presentan focos de infección.

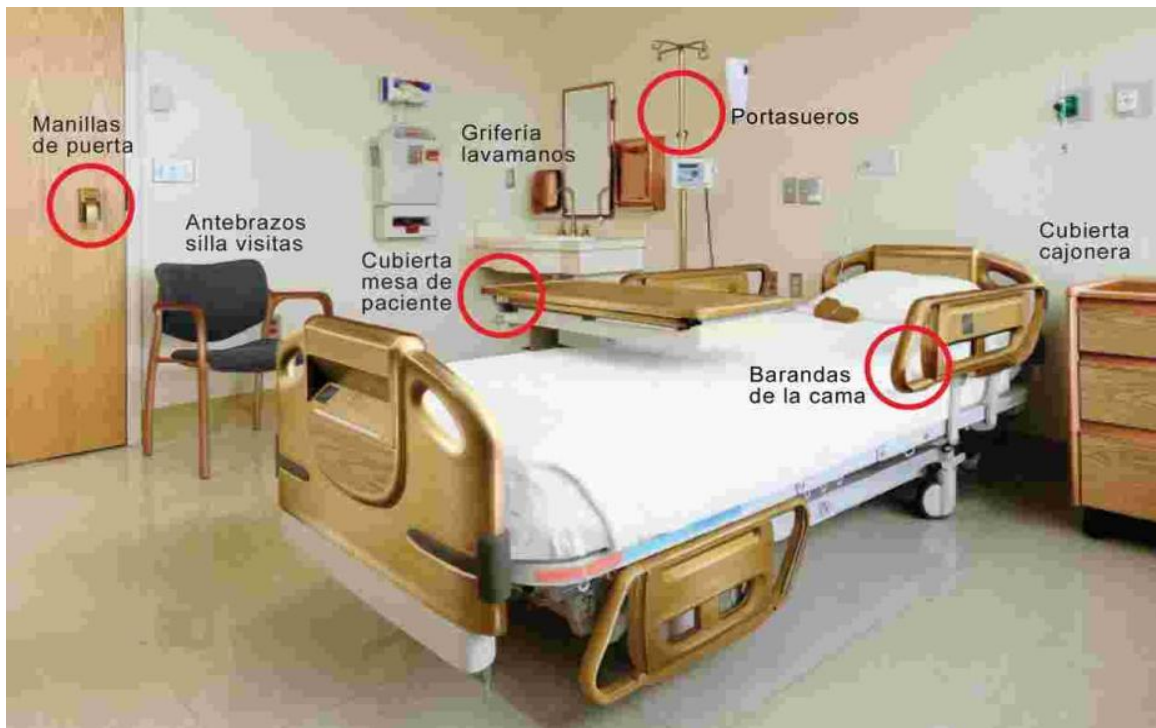


Figura III.6: Sectores donde se presentan infecciones intrahospitalarias [14].

En este contexto, el cobre – dadas sus propiedades biocidas – ha ido ganando aceptación como mecanismo de control de las IIH. En efecto, diversas investigaciones han permitido concluir que los implementos elaborados con cobre pueden llegar a concentrar menos de un 95% de microorganismos que aquellos implementos elaborados con materiales estándares, como acero inoxidable o aluminio (ver Figura III.7) [7] [14].

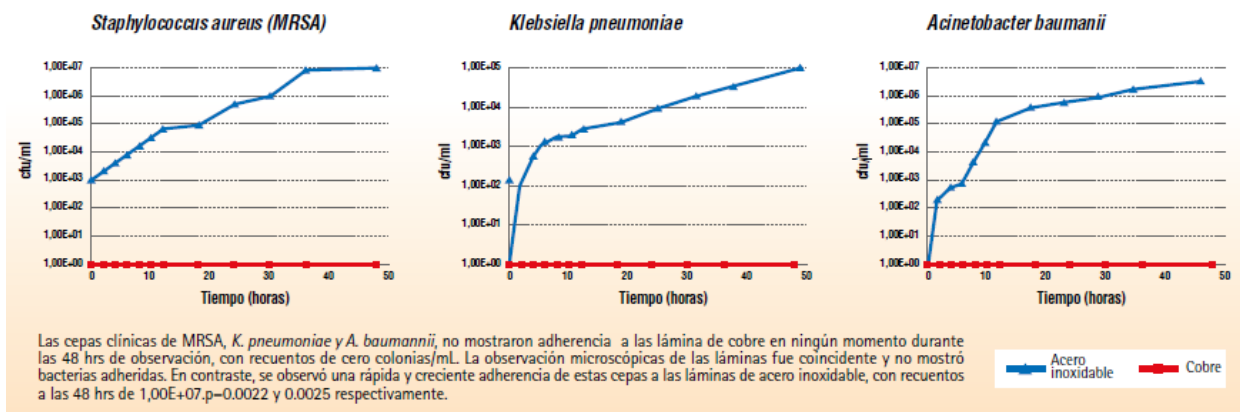


Figura III.7: Ensayo de adherencia bacteria a láminas de cobre y acero inoxidable [7].

III.2.3.2. Angiogénesis

Adicionalmente, se han realizado estudios para analizar la capacidad angiogénica del cobre. En 2010 Gerard y cols. publicaron un estudio sobre la acción de iones de cobre en la actividad angiogénica, la cual se refiere a la capacidad de proliferación de nuevas ramas capilares de los vasos sanguíneos. Dicha proliferación fue estudiada tanto *in vitro*, como *in vivo*, adicionando CuSO_4 a fármacos tradicionales utilizados en la industria farmacéutica para la estimulación de angiogénesis, como son FGF-2 y VEGF [28][29]. Antes de realizar las combinaciones, los autores estudiaron la concentración óptima de cobre, considerando concentraciones entre 25 – 100 $[\mu\text{g}/\text{ml}]$, a partir de lo cual se concluyó que la dosis optima de cobre para la estimulación de angiogénesis está dada en 50 $[\mu\text{g}/\text{ml}]$ de CuSO_4 . Con dicha definición, se llevaron a cabo estudios *in vitro*, en donde se compararon muestras de los fármacos anteriormente mencionados en combinación con cobre y muestras de control sin cobre (ver Figura III.8) [29].

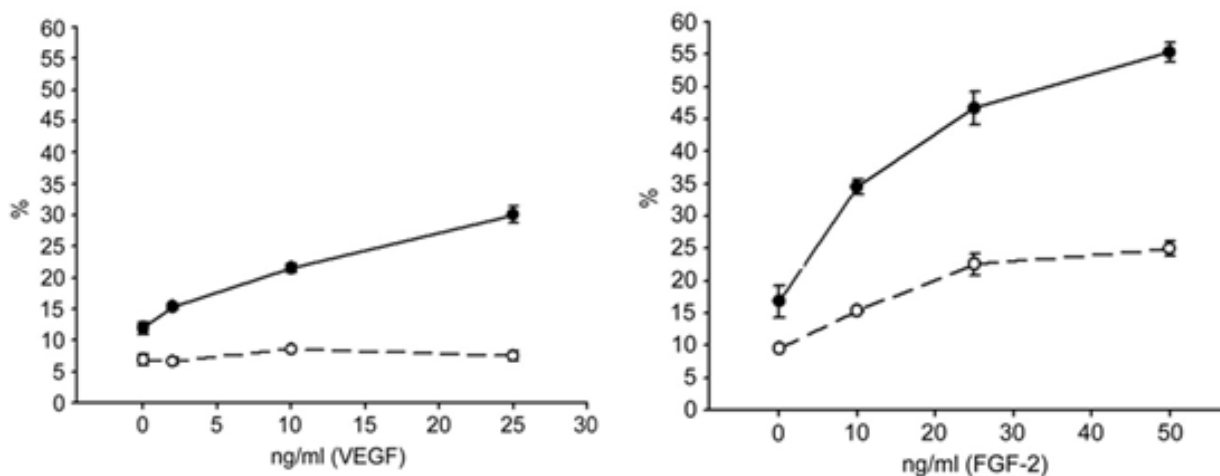


Figura III.8: Estudio *in vitro* de proliferación de células endoteliales con fármacos VEGF y FGF-2 solos (líneas a trazos) y complejos con cobre (líneas continuas) [29].

A nivel *in vitro*, se concluyó que en muestras que combinaban CuSO_4 con dosis crecientes de fármacos existía una mejora significativa en la proliferación endotelial de las células [29].

En el caso de los estudios *in vivo*, se realizaron complejos de CuSO_4 con FGF-2 en variadas dosis de este último (ver Figura III.9). Los análisis permitieron concluir que una vez realizada la infiltración vascular de los complejos, la respuesta mejoraba significativamente respecto a muestras de control que consideraban estimulaciones realizadas sólo con FGF-2 [29].

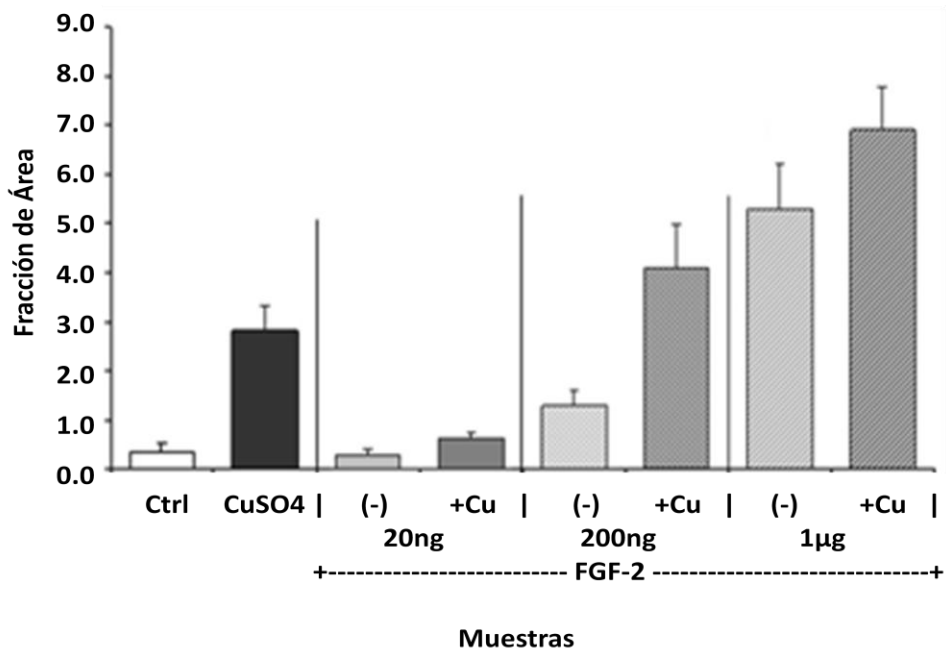


Figura III.9: Área de superficie ocupada por microvasos tras estimulación con diferentes concentraciones de FGF-2 [29].

Estudios similares, como los realizados por Barralet y cols., han analizado el comportamiento de soportes porosos con incorporación de cobre y VEGF, para estimular la vascularización (ver Figura III.10). Luego de diversas pruebas, el estudio concluyó que se producía una inducción de microvasos a partir de los macroporos de los soportes analizados [30].

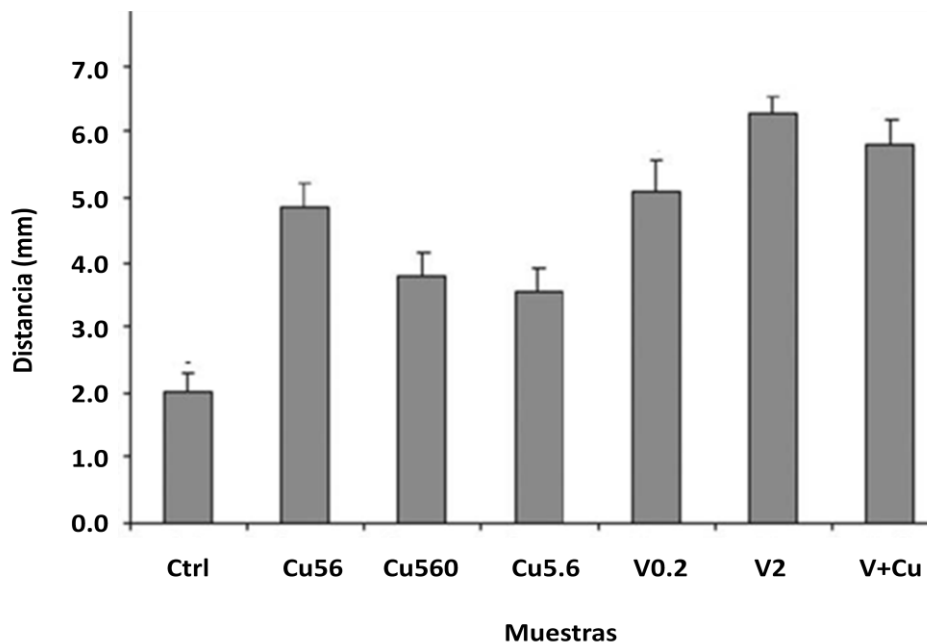


Figura III.10: Estimulación de microvasos a partir de soportes con incorporación de cobre y de VEGF, solo y combinado [30].

III.2.3.3. Propiedades Antiinflamatorias

En adición a lo anterior, diversos estudios han analizado las propiedades antiinflamatorias del cobre. En el año 2003, Razi y cols. estudiaron la efectividad del fármaco Diflunisal, antiinflamatorio y analgésico, como mecanismo de inhibición de la enzima prostaglandina sintetasa. Durante la investigación, se realizaron combinaciones o complejos de este medicamento con y sin sulfato de cobre (ver Figura III.11) [31].

Los resultados de los análisis permitieron demostrar un aumento porcentual de la inhibición de la enzima prostaglandina sintetasa – responsable de formación de edemas – para el complejo conformado por el fármaco y sulfato de cobre, en comparación a la muestra de control que consideraba la droga por sí sola, todo esto para cualquier intervalo de tiempo [31].

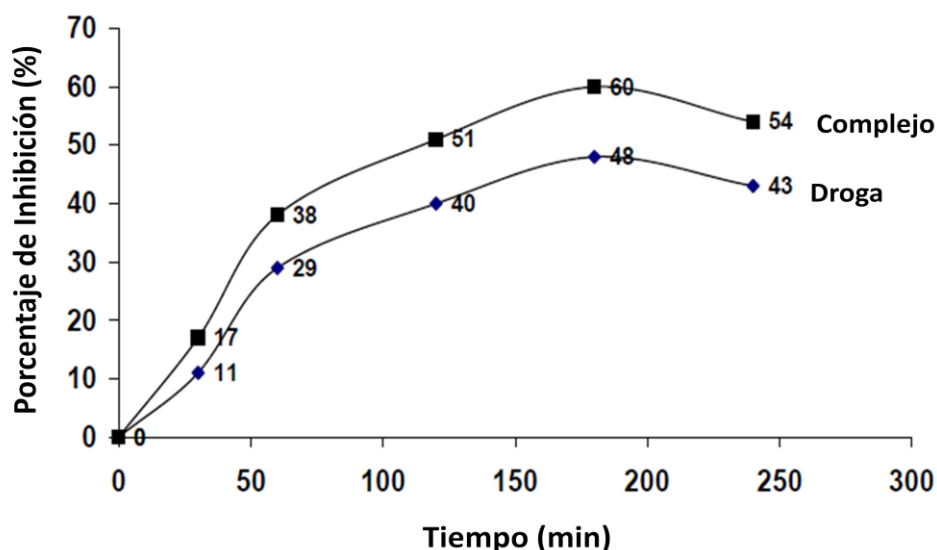


Figura III.11: Comparación del porcentaje de inhibición del edema del Diflunisal solo y combinado con sulfato de cobre [31].

III.2.3.4. Regeneración Ósea y Muscular

De manera similar, se han llevado a cabo estudios relacionados con el rol del cobre en la proliferación y diferenciación de células de tejido óseo. Al respecto, Rodríguez y cols. lograron demostrar una alta diferenciación de células madres mesenquimales, aunque el estudio deja cierta incertidumbre sobre la capacidad de proliferación de las células óseas, debido a que se cree que el gran volumen de células proliferadas evitan el crecimiento de otras [32].

En el mismo campo de proliferación de células osteogénicas, en 2011, Ewald y cols. publicaron un estudio relacionado con el crecimiento de osteoblastos. El trabajo

consideró la utilización de materiales de sustitución ósea (por ejemplo, cementos de fosfato de calcio) utilizados como portadores de factor de crecimiento para la estimulación de osteoblastos alrededor de un implante. Con esta finalidad, se análisis in vitro, sembrando células osteoblásticas sobre soportes brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), en combinación con diferentes concentraciones de cobre (ver Figura III.12) El estudio permitió concluir que los iones de cobre aumentaban la actividad celular y la proliferación de células osteoblásticas, en presencia de cementos de fosfato de calcio [33].

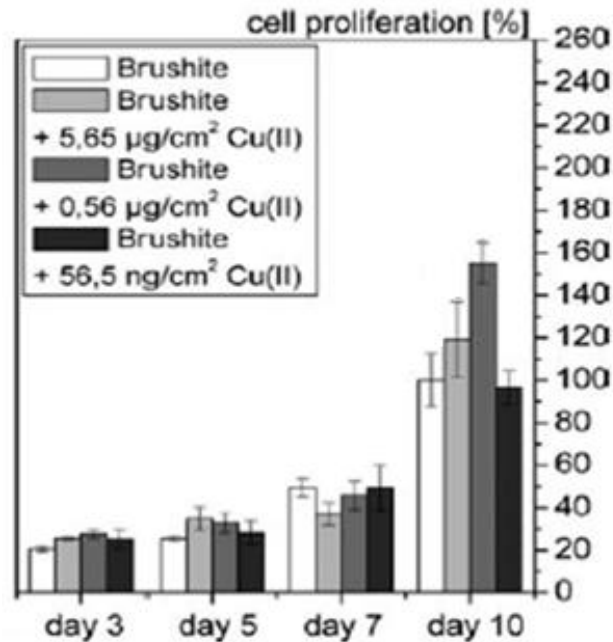


Figura III.12: Actividad celular cultivada en brushita cargada con diferentes concentraciones de Cu (II) durante 10 días [33].

Kothapalli y cols. estudiaron la actividad de nanopartículas de cobre combinadas con ácido hialurónico, con el fin de observar la capacidad de regeneración de elastina fibrilar. Para lo anterior, se suministraron diferentes dosis de nanopartículas de cobre (1, 10 y 400 [ng/ml]), en combinación con concentraciones fijas de oligómeros de ácido hialurónico (0,2 [mg/ml]), obteniéndose interesantes resultados (Figura III.13) [34].

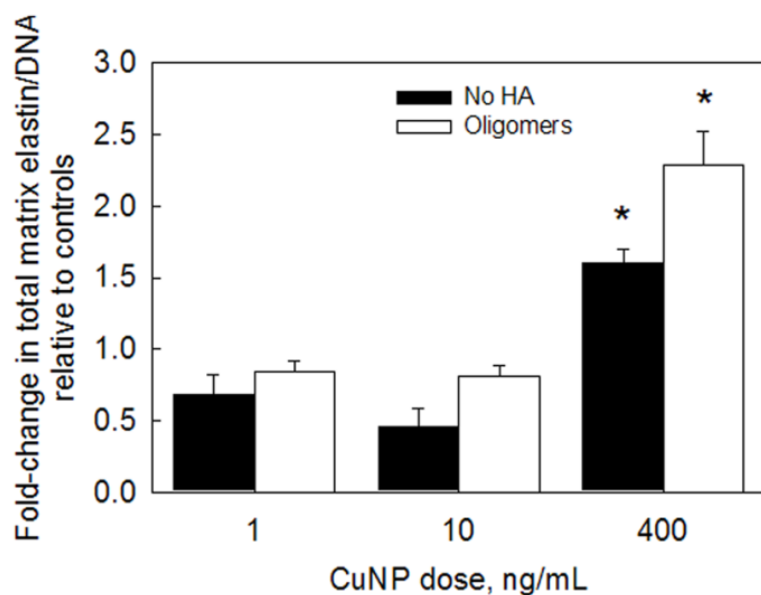


Figura III.13: Actividad de nanopartículas de cobre combinado con ácido hialurónico para la regeneración de elastina [34].

La figura anterior permite concluir que las nanopartículas de cobre, en combinación con oligómeros de ácido hialurónico favorecen la regeneración de matrices de elastina fibrilares en cultivos celulares. Esto constituye un importante avance, por cuanto abre un importante campo de ingeniería de tejidos en base a tejido rico en elastina [34].

III.3. NANOCOMPÓSITOS CON COBRE

Dadas sus propiedades, el cobre ha sido utilizado en diferentes compósitos poliméricos, siendo incorporado en la matriz. En la mayoría de los casos, el metal es agregado con la finalidad de aportar su propiedad bactericida.

Al respecto existe cierta evidencia que sustentaría la utilización del cobre como relleno nanométrico, al menos desde el punto de vista de sus atributos antimicrobianos. Las conclusiones de algunos de estos estudios, se presentan a continuación.

III.3.1. Estudios del cobre en compuestos poliméricos

En esta línea de investigación, se puede mencionar el trabajo realizado por Palza y cols. quienes trabajaron con compuestos de polipropileno, incorporando diferentes cantidades de nanopartículas de cobre. Con dichos nanocompósitos, concluyeron que agregando 1% v/v de nanopartículas de cobre al compósito puro, se lograba disminuir a la mitad el tiempo en que las bacterias se reducían en un 50%, mientras que en cuatro horas se eliminaba más del 99,9% de las bacterias. Adicionalmente, se analizaron

compuestos con concentraciones de nanopartículas superiores a 10% v/v eliminando 99% de las bacterias, en dos horas [35].

Los resultados mencionados anteriormente, se muestran en la Figura III.14, a continuación.

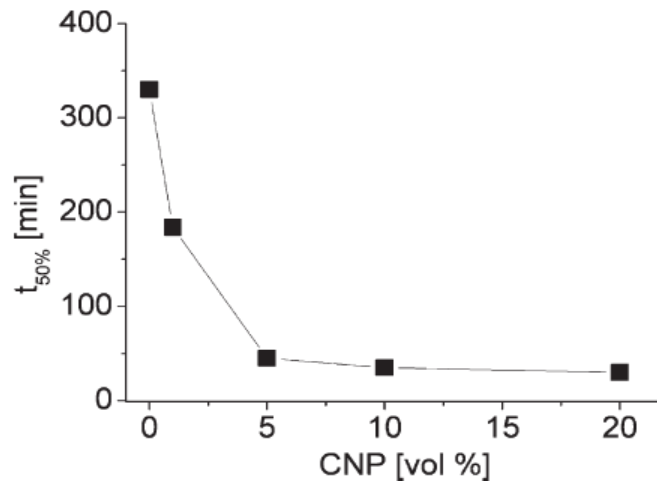


Figura III.14: Efecto de la concentración de nanopartículas de cobre en la matriz de polipropileno sobre el tiempo requerido para matar el 50% de *Escherichia coli* [35].

Por otro lado, Zhang y cols. trabajaron produciendo una superficie antibacteriana de polietileno, en combinación con una concentración de cobre de alrededor de 11%. Los hallazgos del estudio permitieron concluir una alta efectividad antimicrobiana de este nanocompósito, eliminando el 96,2% y 86,1% de las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente [36].

Por su parte, Kamrupi y cols. estudiaron los efectos bacteriostáticos del nanocompuesto de Cu/Poliestireno frente a cuatro tipos de cepas bacterianas (*Pseudomonas fluorescens* BS3, *Bacillus circulens* BP2, *Escherichia coli* DHSα, and *Staphylococcus aureus*), estableciéndose que las muestras con 0,5%, 1,0% y 1,5% de nanopartículas de cobre presentaban un efecto inhibitorio contra todas las cepas, siendo el último de ellos el que presentaba mayor grado de inhibición ante las 4 cepas bacterianas. Por otra parte, las muestras sin nanopartículas de cobre no mostraron ninguna actividad antimicrobiana [37].

Lo anteriormente señalado, se puede observar en la Tabla III.2.

Tabla III.2: Efecto inhibitor de nanopartículas de cobre en la matriz de poliestireno. Zona Media diámetro de inhibición [mm]; (a) desviación estándar; (b) promedio diámetro [37].

Microrganismos	0,0% de Cu*	0,5% de Cu*	1,0% de Cu*	1,5% de Cu*
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0 ^b (0) ^a	9 ^b (0.1) ^a	13 ^b (0.2) ^a	19 ^b (0.2) ^a
<i>Bacillus circulens</i>	0 (0)	11 (0.2)	16 (0.2)	24 (0.2)
<i>Eschericia coli</i>	0 (0)	7 (0.1)	8 (0.1)	10 (0.1)
<i>Sstaphylococcus aureus</i>	0 (0)	4 (0.2)	10 (0.2)	(0.1)

(*) Compósito de Poliestireno

Adicionalmente, se han llevado a cabo estudios que combinan poliuretano con cobre (PU/Cu), como el realizado por Sheikh y cols. quienes analizaron los efectos antimicrobianos de este nanocompósito para *E. coli* y *B. subtilis*, no observándose zonas de inhibición¹ para poliuretano puro, mientras que para PU/Cu con 5%, 7% y 10% de nanopartículas de cobre, apreciándose claras zonas de inhibición [38].

III.3.2. Polímeros analizados

A partir de lo anterior, la presente investigación tuvo como finalidad analizar la biocompatibilidad de nanocompósitos como insumo de prótesis e implante, mediante la utilización de polímeros como el alginato y el TEGMA/BisGMA (Triethylene Glycol Dimethacrylate y Bisphenol A-diglycidyl Dimethacrylate, respectivamente) como fase primaria o matriz, ambos combinados con cobre como relleno.

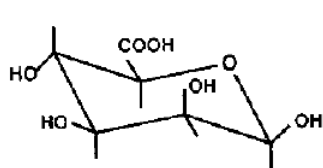
III.3.2.1. Alginato

El alginato es un biomaterial natural al cual se le han encontrado diversas aplicaciones, tanto en la ciencia médica como en la ingeniería, debido a sus importantes propiedades, tales como biocompatibilidad y facilidad de gelificación [39].

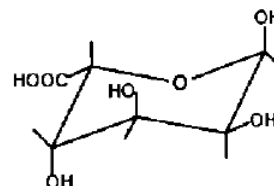
El alginato está presente en la pared celular y las regiones intercelulares de las feofitas de algas café, como sales de calcio, magnesio y sodio, cumpliendo un papel estructural parecido al de la celulosa en las plantas, que otorga fuerza y flexibilidad al tejido del alga. De esta manera, el alginato tiene la propiedad de formar soluciones viscosas o tipo gel, por lo cual es llamado ficocoloide [40][41].

Desde el punto de vista químico, el alginato es un copolímero compuesto de dos estructuras monoméricas o subunidades, el ácido β -D-manurónico (M) y el ácido α -L-gulurónico (G) (Figura III.15), unidas por enlaces glucosídicos, como se muestra en la Figura III.16 [41].

¹ Indicador para la inhibición del crecimiento bacteriano



Ácido β -D-manurónico



Ácido α -L-gulurónico

Figura III.15: Monómeros que conforman la estructura de alginato [42].

Estas subunidades pueden estar distribuidas en diversas cantidades a lo largo de la cadena principal del polímero, a partir de lo cual se pueden generar tres tipos de agrupaciones (ver Figura III.16): [42][43]

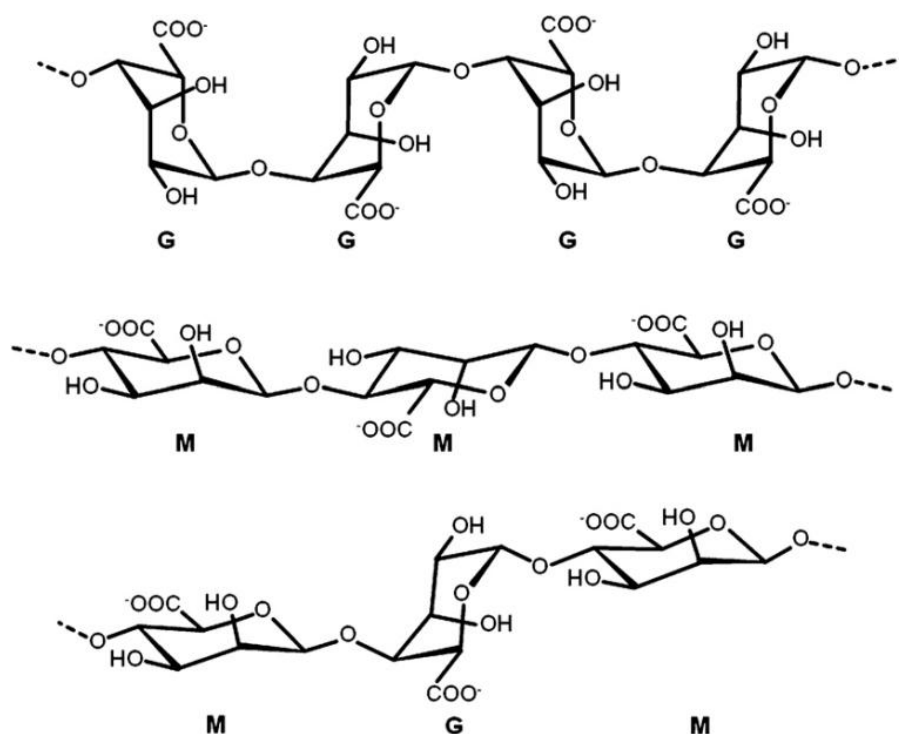


Figura III.16: Estructura química de bloque G, bloque M y bloque alternado de alginato, respectivamente [39].

Es importante señalar que tanto las estructuras monoméricas o subunidades, como la longitud de cada bloque, difieren en función del origen de los alginatos [39]. Debido a lo anterior, los alginatos pueden diferenciarse en su capacidad para contribuir a la formación y estabilidad del hidrogel², a partir de lo cual las propiedades físicas y de composición del polímero pueden verse alteradas [43].

² Material polimérico entrecruzado en forma de red tridimensional de origen natural o sintético, que se hincha en contacto con el agua formando materiales blandos y elásticos.

A continuación, y con la finalidad de obtener un hidrogel, se utiliza un método de entrecruzamiento para unir químicamente dos o más moléculas por medio de enlaces covalentes o iónicos. De esta forma, se pueden emplear cationes polivalentes como agentes de entrecruzamiento para solidificar soluciones de alginato de sodio y así formar geles mecánicamente estables, aunque la afinidad del alginato hacia diferentes iones se ha demostrado que disminuye en el siguiente orden: Pb > Cu > Cd > Ba > Sr > Ca > Co, Ni, Zn > Mn [44].

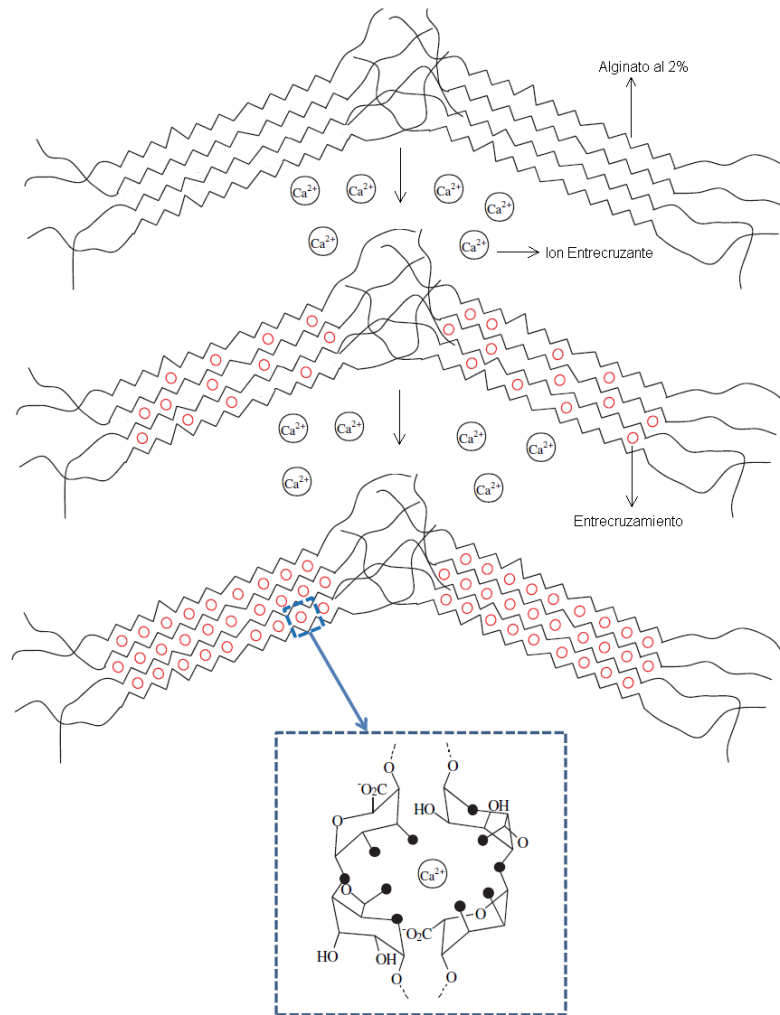


Figura III.17: Entrecruzamiento de alginato con iones calcio [42][45].

En este contexto, entre los cationes más empleados como agentes de entrecruzamiento se encuentran, el calcio (Ca^{+2}) y el bario (Ba^{+2}), los que al suministrarse comienzan a reemplazar al sodio en los extremos carboxílicos del alginato y terminan atrayendo electrostáticamente los extremos aniónicos de dos cadenas adyacentes de alginato (ver Figura III.17) [42][46].

Desde el punto de vista de su funcionalidad, los hidrogeles de alginato han sido particularmente atractivos para su utilización en el proceso de cicatrización de heridas, la administración de fármacos, aplicaciones de ingeniería de tejidos [39] y microencapsulamiento de tejidos para trasplante celular [47].

Sin embargo, el alginato también ha mostrado interacción limitada con la mayoría de células debido a su carácter hidrófilo (tendencia a absorción de agua), producto de la presencia de grupos afines al agua (-OH, -COOH, etc.) [48]. Para analizar las consecuencias del carácter hidrófilo del alginato, se han llevado a cabo estudios de modelamiento de la liberación de solutos en el ámbito de variaciones en la absorción de agua, dentro de los cuales, Pinzón y cols. estudiaron las velocidades de difusión del disolvente (penetración) y del soluto (liberación) que ocurren simultáneamente en un hidrogel, modelando los perfiles de velocidades de ambos procesos, como se muestra a continuación (Figura III.18) [48].

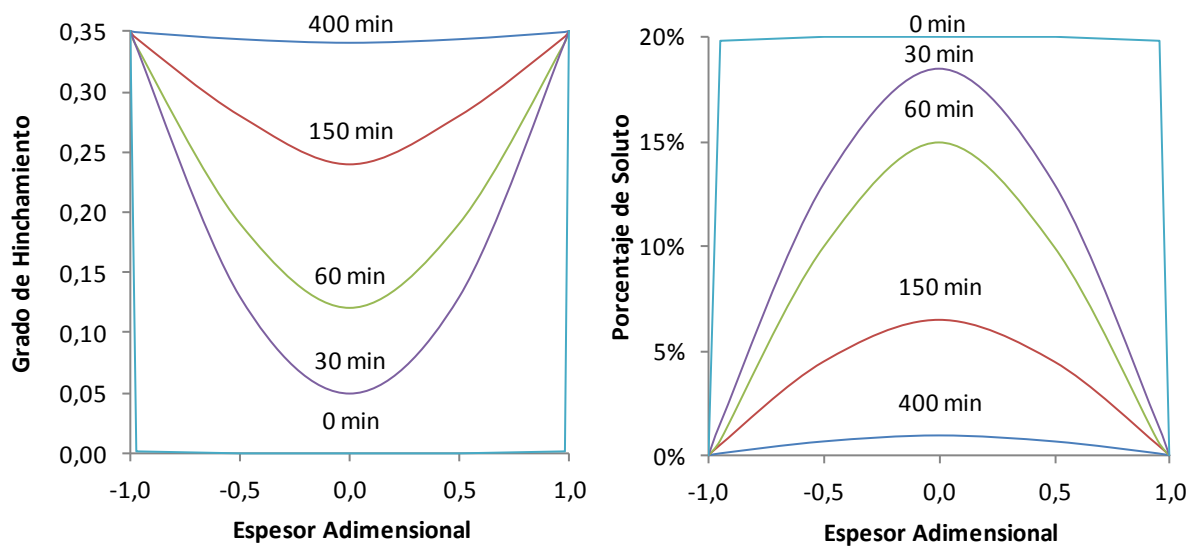


Figura III.18: Perfiles de concentración de disolvente (grado de hinchamiento³) y de concentración de soluto (porcentaje de soluto) [48].

A partir de la figura anterior, se puede apreciar que la liberación de soluto y absorción de agua se encuentran directamente relacionadas en función del tiempo. En efecto, en la medida que aumenta el tiempo, el grado de hinchamiento se incrementa, mientras que el contenido de soluto presente en el hidrogel tiende a disminuir.

Adicionalmente, se debe tener en cuenta que el grado de entrecruzamiento⁴ es el principal parámetro de influencia en las propiedades de resistencia mecánica, hinchamiento y difusión, además de brindar una estructura porosa. Esta última se

³ Balance entre las interacciones específicas repulsivas y atractivas que existen en la red del hidrogel.

⁴ Número de entrecruzamientos que existen por unidad de volumen.

encuentra influenciada por ciertos parámetros como la concentración del agente entrecruzante, peso molecular, pH y temperatura [49].

Finalmente, es importante señalar que el carácter hidrófilo del hidrogel conlleva a una baja adsorción de proteínas y a una alteración de la adhesión celular hacia este biomaterial [50]. Dicha adhesión celular puede ser aumentada mediante la modificación covalente del polímero con moléculas tales como, el tri-amino péptido y ácido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) [43].

III.3.2.2. TEGMA/BisGMA

Las resinas dentales compuestas, dentro de las cuales el TEGMA/BisGMA ha ganado importancia en el último tiempo, han sido utilizadas como biomateriales para restaurar piezas dentales deterioradas hace más de cinco décadas y en comparación con las amalgamas dentales tradicionales, tienen menos problemas de seguridad y poseen mejores propiedades estética.

En efecto, las resinas dentales compuestas se utilizan en más del 95% de las restauraciones directas de piezas dentales frontales y aproximadamente en el 50% de las restauraciones directas de piezas dentales posteriores.

Toda resina dental compuesta está formada por dos monómeros, un iniciador y un co-iniciador. En el caso particular del TEGMA/BisGMA, se utilizan como iniciador y co-iniciador, la canforquinona y etil-4-(N,N'-dimetilamino) benzoato, respectivamente, cuyas composiciones se observan a continuación (Figura III.19).

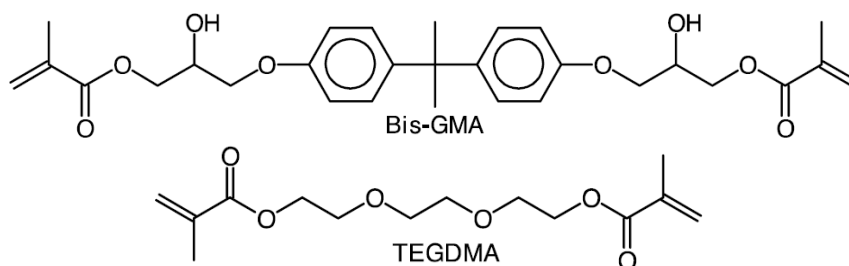


Figura III.19: Componentes del copolímero TEGMA/BisGMA [51].

El TEGMA/BisGMA se sintetiza por el mecanismo de condensación, también conocido como fotopolimerización inducido por lámparas tipo LED. La principal misión de la lámpara de fotoactivación está en el proceso de endurecimiento de la resina, lo cual consiste en la activación del fotoiniciador junto al catalizador alifático, existentes en la formulación del material, mediante su energía lumínica. A partir de este estímulo, los

monómeros antes mencionados desencadenan una reacción química de transformación del producto inicial, en el producto final deseado. Estos monómeros son especialmente sensibles a la energía lumínica en el rango de los 470-475 [nm] de longitud de onda (luz azul) y provocan, tras su fotoactivación, la aparición de radicales libres capaces de desencadenar la reacción química deseada [51][52][53].

Es importante señalar que en este proceso, las resinas liberan monómeros residuales y otras sustancias a causa de una tasa de conversión de 35-77%, cuando son fotocurados directamente por luz halógena o LED. Sin embargo, pueden alcanzar un 80% cuando las resinas compuestas son post-curadas indirectamente bajo condiciones de laboratorio disímiles, incluyendo la luz de alta intensidad, temperatura, presión, o la combinación de estos factores [52][54].

Adicionalmente, muchos estudios han concluido que el BisGMA y TEGMA, además de otros polímeros no cubiertos en la presente investigación – como el UDMA y el HEMA – pueden producir daños celulares potenciales, a la vez que otras investigaciones han descubierto que la canforquinona (fotoiniciador), presenta altos niveles de citotoxicidad y que además actúa como agente mutagénico [55].

De esta forma, el TEGMA se libera fácilmente a partir de compuestos polimerizados en medios acuosos y representa la mayor parte de los dobles enlaces no reaccionados y, debido a su naturaleza lipofílica, puede penetrar fácilmente en la citosol y la membrana de compartimientos lipídicos de las células [54].

Por su parte, el BisGMA puede contribuir significativamente a la citotoxicidad de las resinas y a pesar de presentar un carácter hidrofóbico, se libera a medios acuosos, siendo capaz de ejercer su acción citotóxica. Además, a concentraciones mucho más bajas el BisGMA, en comparación con el TEGMA, puede llegar a ser más citotóxico [54].

A pesar de lo anterior, las resinas han ido tomando lugar en el campo de la odontología debido a la estética que estas pueden llegar a presentar pese a las excelentes propiedades físicas que caracterizan a las amalgamas.

III.4. CULTIVOS Y LÍNEAS CELULARES

Como se mencionará, los ensayos de viabilidad a los nanocompósitos se realizaron con líneas celulares (línea curva negra en la Figura III.20), las cuales provienen de cultivos primarios (zona naranja en la Figura III.20), que se producen por primera vez en la vida de la célula, es decir, son cultivos donde la célula es extraída directamente del tejido y aislada [56].

A continuación, la línea celular puede ser subcultivada en reiteradas oportunidades, hasta que se produzca la muerte celular asociada a una línea celular finita (zona verde en la Figura III.20). Sin embargo, también existen líneas celulares que sufren transformaciones espontáneas o manipuladas por algunos factores mutagénicos y crecen indefinidamente, pasando a ser una línea celular continua (zona azul en la Figura III.20) [56].

Lo anterior, es resumido gráficamente en la Figura III.20.

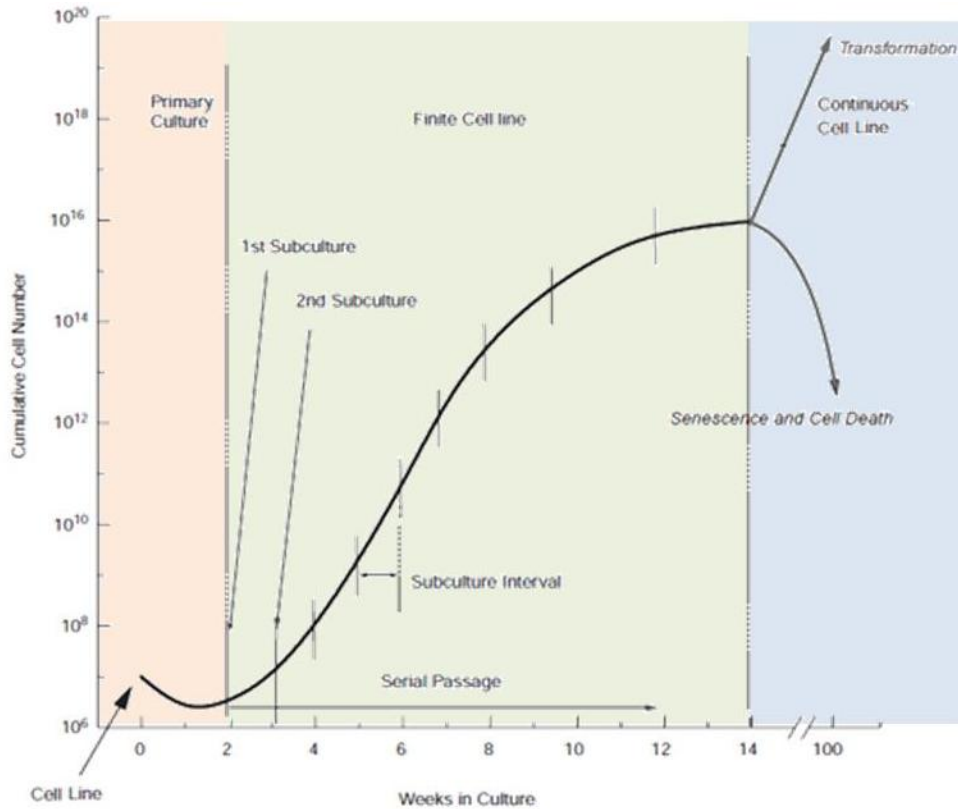


Figura III.20: Evolución de una línea celular [56].

Dentro de las líneas celulares continuas, es decir, ya manipuladas o transformadas y con un crecimiento indefinido, se pueden destacar la CNh y SAOS-2.

Como se mencionara anteriormente, el alginato debe ser trabajado en conjunto con cationes como Ca^{+2} , Ba^{+2} , etc. parte de los cuales pueden llegar a ser tóxicos para las células eucariontes, como es el caso del catión de calcio divalente Ca^{+2} , que pese a ser utilizado como molécula para regular la producción de energía, metabolismo celular y fenotipo, también ha sido evaluado en diversos estudios que han concluido que dicho catión induce a la muerte celular. Este efecto se produciría tanto al unirse y activar los receptores de muerte de las células, así como al generar un efecto tóxico directo sobre la mitocondria y el retículo endoplasmático, los cuales son fundamentales para el

crecimiento celular (ver Figura III.21) [57][58]. Respecto a lo anterior, se debe tomar en cuenta que la concentración de Ca^{2+} extracelular tiene que ser alrededor de 2 mM, mientras que la del citoplasma varía entre 50-100 nM [59].

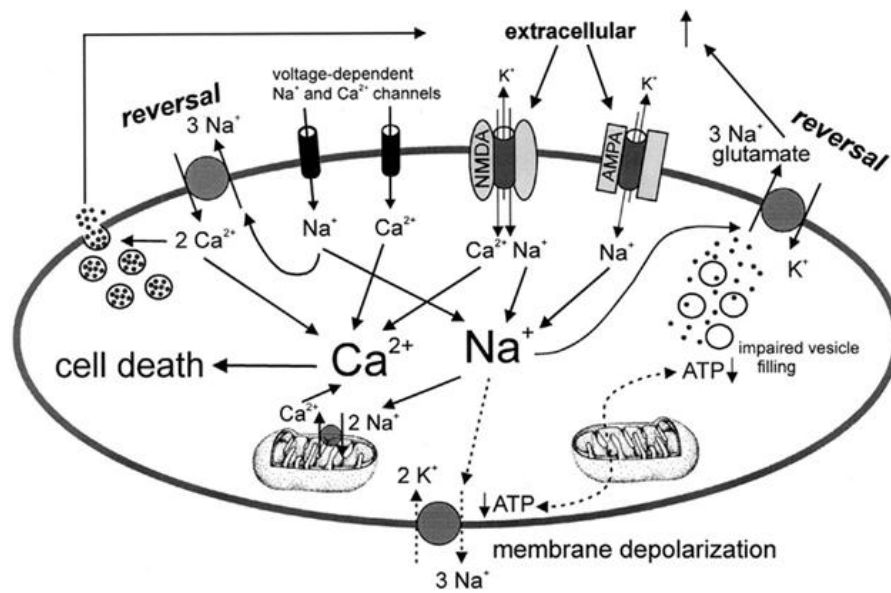


Figura III.21: Influencia del Ca^{2+} en la muerte celular.

CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA

Para el cumplimiento de los objetivos de este proyecto de investigación, se aplicaron diferentes metodologías, que incluyeron variadas etapas de trabajo de laboratorio, análisis de resultados y repetición de experimentos.

Como se mencionara anteriormente, se generaron nanocompósitos poliméricos, tanto de alginato como de TEGMA/BisGMA, como biomaterial principal, en combinación con diferentes concentraciones de cobre, como material de relleno.

En paralelo, se debieron preparar subcultivos para ensayos, lo que consideró la utilización y acondicionamiento de reactivos. Posteriormente, se realizaron estudios de viabilidad celular por medio de MTT. De igual forma, se realizaron estudios de lixiviación de iones cobre por lo cual se debieron tomar en cuenta la preparación de reactivos correspondientes para realizar dichas mediciones.

Las etapas antes mencionadas implicaron un trabajo multidisciplinario, llevándose a cabo en diversos laboratorios, tales como, el Laboratorio de Ingeniería de Polímeros de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, el Laboratorio de Terapia Celular de la Facultad de Medicina y el Laboratorio Nanomateriales de la Facultad de Odontología, todos pertenecientes a la Universidad de Chile.

Las metodologías y etapas antes mencionadas, se describen a continuación con mayor detalle.

IV.1. PREPARACIÓN DE NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS

A lo largo de este trabajo de título se estudiaron diferentes nanocompósitos poliméricos, los que fueron generados en base a alginato y TEGMA/BisGMA – como matriz – y utilizando distintas concentraciones de cobre. A continuación, se describe la preparación de cada uno de estos compósitos poliméricos analizados.

IV.1.1. Preparación de Nanocompósitos de Alginato

Los nanocompósitos de alginato se prepararon en el Laboratorio de Terapia Celular, generándose en formato tanto esférico como de discos, ambos de 5 [mm] de diámetro, aproximadamente.

La metodología utilizada para preparar este nanocompósito fue la siguiente:

1. Mezclar agua Ultra Pura con nanopartículas de cobre, en la concentración deseada, bajo agitación magnética.

2. A la mezcla anterior, agregar alginato hasta generar una solución al 2% p/v, en pequeñas cantidades, para evitar aglomeraciones, y manteniendo agitación magnética. La concentración de cobre agregado, se calcula a partir de la cantidad de alginato añadido a la solución.
3. Preparada la mezcla, se vierten gotas en una solución entrecruzante (cloruro de bario o cloruro de calcio) al 20 [mM], obteniendo de esta forma esferas de alginato y discos de alginato a partir de dichas esferas.

El detalle de la composición de cada nanocompósito preparado y solución entrecruzante se encuentran en la Tabla VIII.1 y Tabla VIII.2, adjuntas en Anexos.

IV.1.2. Preparación de Nanocompósitos de TEGMA/BisGMA

Los nanocompósitos de TEGMA/BisGMA fueron preparados en el Laboratorio Nanomateriales. Se realizaron nanocompósitos de 1 [mm] de espesor con un diámetro aproximado de 5 [mm].

La generación de estos nanocompósitos implicaron las siguientes etapas:

1. Combinar 49,5% de TEGMA, 49,5% de BisGMA, 0,2% de Camphorquinone al 97% y 0,8% de Ethyl-4-dimethylamino-benzoate al 99%, en un vaso precipitado. La posterior mezcla con nanopartículas de cobre debe realizarse sólo con los monómeros TEGMA y BisGMA. Luego de dicha mezcla con cobre, se agregan los demás materiales.
2. Acondicionar una placa de teflón con orificios del tamaño deseado, donde se realizará el vertido de la mezcla, para realizar la polimerización.
3. Una vez vertida la mezcla en la placa de teflón, se realiza la polimerización a través de la utilización de una lámpara de fluorescencia. Esta lámpara, denominada Elipar 2500, posee luz halógena de 470 [nm], la que se aplica durante un intervalo de tiempo de 40 [s] a 1 [min], aproximadamente, a la mezcla antes mencionada.
4. Repetir lo anterior, por ambos lados del copolímero.
5. Esperar y retirar los nanocompósitos desde la placa de teflón.

El detalle de la composición de cada nanocompósito preparado se encuentra en la Tabla VIII.25, adjunta en Anexos.

IV.2. PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA CULTIVOS Y SUBCULTIVOS CELULARES

La realización de los experimentos de viabilidad celular con los nanocompósitos se trabajaron con dos tipos de líneas celulares:

- ✓ Línea celular CNh: proveniente de la corteza cerebral de un ratón fetal normal, de tipo eucarionte. Dicha línea es muy utilizada para estudios de cultivos en laboratorio, debido a su facilidad de manipulación y su semejanza a células humanas. Estas células son de tipo adherente, por su necesidad de adherirse a un sustrato para crecer, proliferar y realizar normalmente sus funciones, presentando un tiempo de adherencia de aproximadamente cuatro horas y una tasa de duplicación cercana a las nueve horas. Son cultivadas en Medio de Eagle modificado por Dubelcco (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino adulto, 2,5% de suero bovino fetal y, adicionalmente, con gentamicina y/o ketoconazol e incubadas a 37°C de temperatura y 5% CO₂.
- ✓ Línea celular SAOS-2: proviene de osteosarcomas de osteoblastos humanos. Estas células de tipo adherente, es decir, que requieren de la adherencia a un sustrato para poder crecer, proliferar y realizar sus funciones normales. Son cultivadas en Medio de Eagle modificado por Dubelcco (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal y, adicionalmente, con gentamicina y/o ketoconazol e incubadas a 37°C de temperatura y 5% CO₂.

Para trabajar con estas líneas, se debió realizar la preparación de medios de cultivo (con y sin suero), solución D y tripsina, los que constituyen soluciones necesarias para la realización de cultivos / subcultivos de células y ensayo de viabilidad celular, el cual será descrito posteriormente en mayor detalle. Dichos procedimientos son descritos a continuación.

IV.2.1. Medio de Cultivo

El medio de cultivo es un material alimenticio utilizado para el desarrollo de los microorganismos en un ambiente de laboratorio. Este alimento presenta los nutrientes necesarios para permitir - en condiciones favorables y específicas, tanto de pH, como de temperatura - el crecimiento de virus, células, bacterias, tejidos vegetales, etc.

En el contexto de esta investigación, se utilizaron medios de cultivo con y sin suero, según se describe a continuación:

IV.2.1.1. Medio de cultivo sin suero

La composición del medio de cultivo sin suero, que fue utilizado en este trabajo de título, se muestra en la Tabla IV.1.

Tabla IV.1: Composición del Medio de Cultivo sin suero.

Compuesto	Concentración	Cantidad
DMEM/F12	12 [g/lt]	12 [g]
Bicarbonato (CO ₃)	1 [g/lt]	1 [g]
Gentamicina	40 [mg/lt]	40 [mg]
Volumen Total		1 [lt]

El procedimiento de preparación de este medio de cultivo, se describe a continuación:

1. Agregar 12 [g] de DMEM/F12, 1 [g/lt] de Bicarbonato y 40 [mg/lt] de Gentamicina en un vaso precipitado.
2. Agregar 1000 [ml] de agua UltraPura para preparar un litro de reactivo.
3. Ajustar el pH a 7,4.
4. Filtrar la mezcla mediante la utilización de una membrana con tamaño de poro de 0,2 [µm].

IV.2.1.2. Medio de cultivo con suero

La composición del medio de cultivo con suero, utilizado en esta investigación, se muestra en la Tabla IV.2.

Tabla IV.2: Composición del Medio de Cultivo con suero para CNh.

Compuesto	Concentración	Cantidad
Suero Bovino Fetal	2,5%	5 [ml]
Suero Bovino Adulto	10,0%	20 [ml]
Ketoconazol		200 [µl]
Volumen Total		200 [ml]

De forma similar al caso anterior, el procedimiento de preparación del medio de cultivo con suero, consiste en las siguientes etapas:

1. Agregar 5 [ml] de suero bovino fetal, 20 [ml] de suero bovino adulto y 200 [µl] de ketoconazol en un vaso precipitado.

2. Aforar con medio de cultivo sin suero hasta completar 200 [ml].
3. Filtrar la mezcla anterior a través de una membrana con tamaño de poro de 0,2 [μ m].

Mientras la composición de suero antes descrita es utilizada para la línea celular CNh, la línea celular SAOS-2 requiere de un medio de cultivo con suero como el que se muestra en la Tabla IV.3.

Tabla IV.3: Composición del Medio de Cultivo con suero para SAOS-2.

Compuesto	Concentración	Cantidad
Suero Bovino Fetal	10,0%	20 [ml]
Ketoconazol		200 [μ l]
Volumen Total		200 [ml]

El procedimiento de preparación de este medio de cultivo es idéntica que aquella descrita anteriormente, para el medio de cultivo con suero para línea celular CNh.

IV.2.2. Solución D

La solución D es una solución compuesta por sales, siendo utilizada para lavar cultivos celulares, a través de la eliminación de células muertas del cultivo. La composición de la solución D, utilizada en esta investigación, se muestra en la Tabla IV.4.

Tabla IV.4: Composición de la Solución D.

Compuesto	Concentración	Cantidad
Cloruro de Sodio (NaCl)	137 [mM]	8 [g]
Cloruro de Potasio (KCl)	5,4 [mM]	0,4 [g]
Fosfato Disódico	0,17 [mM]	0,024 [g]
Fosfato Monopotásico	0,22 [mM]	0,029 [g]
Glucosa	5,5 [mM]	1,08 [g]
Sacarosa	5,9 [mM]	2 [g]
Volumen Total		1 [lt]

Por su parte, la generación de esta solución implica la aplicación del siguiente procedimiento:

1. Agregar en un vaso precipitado 8 [g] de NaCl a 137 [mM]; 0,4 [g] de KCl a 5,4 [mM]; 0,024 [g] de Na₂HPO₄ a 0,17 [mM]; 0,029 [g] de KH₂PO₄ a 0,22 [mM]; 1,08 [g] de glucosa a 5,5 [mM] y 2 [g] de sacarosa a 5,9 [mM].
2. Agregar 1000 [ml] de agua Ultra Pura para generar un litro de reactivo.

3. Ajustar el pH a nivel 7,4.

4. Filtrar a través de una membrana con tamaño de poro de 0,2 [µm].

Antes de utilizar, se vuelven a filtrar 200 [ml] de la solución a través de una membrana con tamaño de poro de 0,2 [µm].

IV.2.3. Tripsina EDTA 0,2%

La tripsina es una enzima cuya función es romper las proteínas de unión de las células cultivadas, que las adhieren a la placa en que se moldean. Por lo tanto, la tripsina facilita la suspensión de las celular en una solución, de tal forma de ser transferidas a placas frescas.

La composición de la solución de tripsina al 0,2% se presenta en la Tabla IV.5, a continuación:

Tabla IV.5: Composición de la Tripsina 0,2%.

Compuesto	Concentración	Cantidad
Tripsina	0,2%	0,2 [g]
Volumen Total		100 [ml]

Para llevar a cabo la preparación de la tripsina, se debe seguir el procedimiento que se presenta a continuación:

1. Diluir 0,2 [g] de tripsina en 100 [ml] de solución D.

2. Filtrar a través de una membrana con un tamaño de poro de 0,2 [µm].

IV.3. PREPARACIÓN DE CULTIVOS Y SUBCULTIVOS CELULARES

Para los estudios de viabilidad y proliferación celular que se debieron realizar en esta investigación, se llevaron a cabo preparaciones de cultivos y subcultivos, en la sala de cultivo especialmente adaptada del Laboratorio de Terapia Celular.

IV.3.1. Preparación de cultivos

Para la preparación de cultivos celulares se dispone de una placa Petri de 9 [cm] de diámetro, la que contiene la línea celular (CNh o SAOS-2). A continuación, para la preparación del cultivo celular, se llevan a cabo las siguientes etapas:

1. Extraer el medio de cultivo que contiene la placa Petri.

2. Lavar 2 a 3 veces la placa con solución D, para extraer la mayor cantidad de células muertas
3. Verter 2 [ml] de tripsina EDTA en la placa, con el fin de disociar las células que permanecen en ella y así poder re-suspenderlas posteriormente en medio de cultivo. Luego, se deja actuar la tripsina por unos minutos.
4. Sembrar 1 [ml] de la solución anterior en una nueva placa, obteniéndose dos placas con 1 [ml] de solución cada una.
5. Agregar a cada placa 9 [ml] de medio de cultivo con suero, para aforar hasta los 10 ml y homogenizar.
6. Dejar incubar a 37°C y 5% de CO₂.

IV.3.2. Preparación de subcultivos para células CNh

Para la preparación de subcultivos se dispone de una placa de 96 pocillos, con un diámetro de 6 [mm] cada uno, aproximadamente.

El proceso de preparación de subcultivos consta de las siguientes etapas:

1. Extracción del medio de cultivo que contiene la placa Petri nombrada anteriormente.
2. Lavado de la placa Petri 2 a 3 veces con solución D, para extraer la mayor cantidad de células muertas.
3. Verter 2 [ml] de tripsina EDTA con el fin de disociar las células que permanecen en la placa Petri y así poder re-suspenderlas en medio de cultivo. Luego, se deja actuar la tripsina por unos minutos y se agregan 3 [ml] de medio de cultivo, a partir de lo cual, las células están listas para ser re-sembradas.
4. Realización de cuantificación celular, para llevar a cabo un re-sembrado de 5.000 células por pocillo, aproximadamente.
5. Preparar la placa de 96 pocillos (6,4 [mm] de diámetro por cada pocillo) con su respectivo control (0% de células y 100% de células) y los compósitos poliméricos a evaluar.

6. Agregar 195 [μl] de medio de cultivo con suero por pocillo, aproximadamente. El medio tiene que cubrir perfectamente el polímero.
7. Sembrar las células en cada uno de los pocillos para realizar los ensayos de viabilidad celular, mediante la aplicación de aproximadamente 5 [μl] de la solución obtenida en el punto 3, dependiendo de la confluencia celular que presente la placa Petri.
8. Incubar a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas.

IV.3.3. Preparación de subcultivos para células SAOS-2

De forma similar que al caso anterior, para la preparación de subcultivos se dispone de una placa de 96 pocillos, con un diámetro de 6 [mm] cada uno, aproximadamente.

El proceso de preparación de subcultivos consta de las siguientes etapas:

1. Extracción del medio de cultivo que contiene la placa Petri nombrada anteriormente.
2. Lavado de la placa Petri 2 a 3 veces con solución D, para extraer la mayor cantidad de células muertas.
3. Verter 2 [ml] de tripsina EDTA con el fin de disociar las células que permanecen en la placa Petri y así poder re-suspenderlas en medio de cultivo. Luego, se deja actuar la tripsina por unos minutos y se agregan 3 [ml] de medio de cultivo, a partir de lo cual, las células están listas para ser re-sembradas.
4. Realización de cuantificación celular, para llevar a cabo un re-sembrado de 5.000 células por pocillo, aproximadamente.
5. Preparar la placa de 96 pocillos (6,4 [mm] de diámetro por cada pocillo) con su respectivo control (0% de células y 100% de células) y los compósitos poliméricos a evaluar.
6. Agregar 190 [μl] de medio de cultivo con suero por pocillo, aproximadamente. El medio tiene que cubrir perfectamente el polímero.
7. Sembrar las células en cada uno de los pocillos para realizar los ensayos de viabilidad celular, mediante la aplicación de aproximadamente 10 [μl] de la

solución obtenida en el punto 3, dependiendo de la confluencia celular que presente la placa Petri.

8. Incubar a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas.

IV.3.4. Cuantificación de células

La cuantificación celular se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento:

1. Diluir 10 [μl] de muestra, medio de cultivo con suero y células, en 10 [μl] de Azul Tripán.
2. Seleccionar una muestra de la solución generada del punto anterior y depositarla en vidrio Neubauer.
3. Utilizar contador y microscopio para cuantificar las células.
4. Obtener un promedio de la cuantificación y multiplicarlo por un factor de dilución y luego por 10.000. De esta forma se obtiene el conteo de células por ml.
5. Mediante la aplicación de regla de tres, extrapolar las células totales presentes en la solución de 5ml explicitada en la sección anterior.

IV.4. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

Para la realización de estudios de citotoxicidad en líneas celulares, existen diferentes tipos de ensayos que se pueden llevar a cabo, existiendo algunos que actúan sobre la membrana celular (Azul de Tripán, Calceina AM, Live/Dead, etc), mientras que otros actúan sobre el metabolismo, tanto mitocondrial, como celular en general (MTT y alamar Blue, respectivamente) [60].

Dentro de la gran variedad de métodos de análisis de citotoxicidad, a continuación se describe uno de ellos, el ensayo MTT.

Este ensayo o metodología se utiliza para determinar el efecto citotóxico de un compuesto sobre cultivos de células normales y osteoblastos.

El reactivo MTT, bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol], es una sal de tetrazol que puede ser absorbida activamente por células cultivadas y reducida en una reacción dependiente de la actividad mitocondrial, generando formazán y virando su color (ver Figura IV.1).

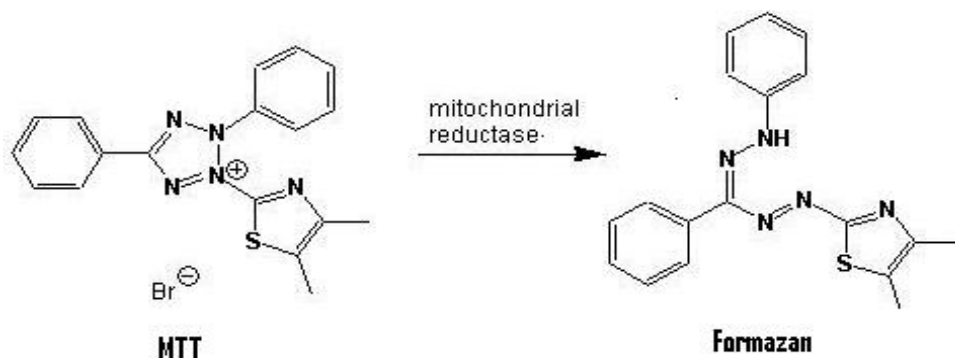


Figura IV.1: Reducción del MTT al Formazán.

Este producto – formazán – se acumula en el interior de las células, ya que no es capaz de atravesar la membrana celular. Sin embargo, tras la adición de un disolvente, como isopropanol, los cristales de formazán se disuelven, pudiendo cuantificar colorimétricamente la intensidad del cambio de color mediante técnicas de espectroscopía (ver Figura IV.2).

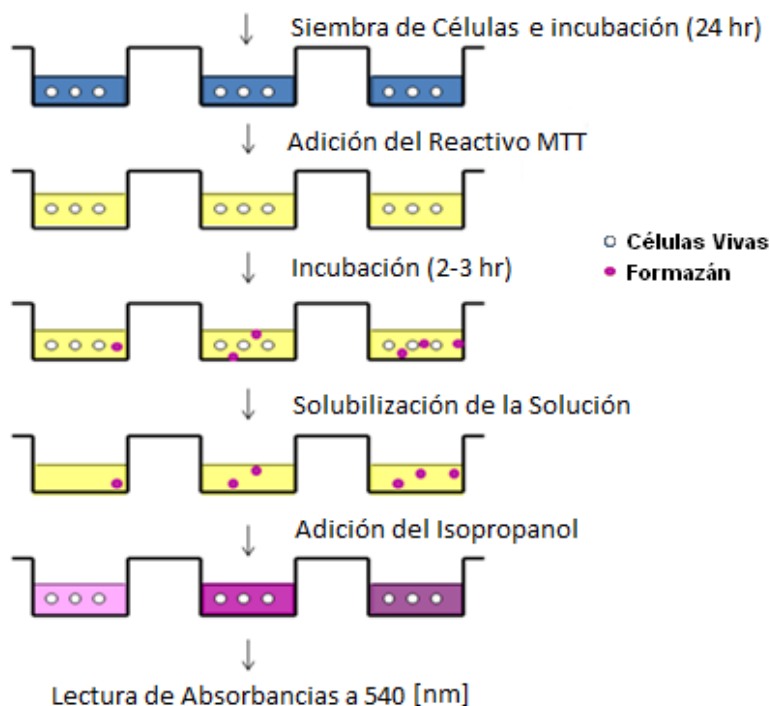


Figura IV.2: Esquema del ensayo MTT realizado en incubación a 37°C, 5% CO₂.

Este método ha sido utilizado, principalmente, para la medición de supervivencia celular, en donde la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

A continuación, se describe la metodología llevada a cabo para el ensayo MTT:

1. Retirar la placa de 96 pocillos de la incubadora. Cada uno de los pocillos es lavado cuidadosamente, agregando aproximadamente 100 [μl] de solución D.
2. Extraer la solución anterior a través de pipetas, para luego agregar 100 [μl] de medio de cultivo sin suero + MTT, por cada pocillo (considerando 80μl de MTT/ml de medio de cultivo sin suero).
3. Incubar por 2-3 horas para permitir la formación de los cristales de formazán. Estos cristales quedan retenidos por las células.
4. Eliminar el sobrenadante y adicionar 200 [μl] de isopropanol por pocillo. Esto provoca la solubilización del formazán. Dejar actuar por unos minutos a temperatura ambiente.
5. Realizar la lectura de densidad óptica en un espectrofotómetro (Lector Elisa) a una longitud de onda de 540 [nm].

Por su parte, para la preparación del reactivo MTT, se procede de la siguiente manera:

1. Pesar 25 [mg] de bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5 difeniltetrazólico (MTT) y diluir en 5 [ml] de solución D.
2. Almacenar en tubos Eppendorf de 1 [ml] y cubrirlos con papel aluza

IV.5. ENSAYO DE LIBERACIÓN DE IONES COBRE

En este ensayo se utiliza una técnica de colorimetría para medir absorbancia a una longitud de onda de 455 [nm], siendo necesaria la utilización de un fotómetro UV visible. El equipo mide la luz absorbida, dependiendo directamente de la concentración que hay en la muestra, de la longitud de celda atravesada por la muestra, del tipo de solución y de la longitud de onda del haz incidente.

Los tiempos de medición dependerán principalmente de la capacidad de liberación del compósito que se estudie, debido a que estos pueden presentar diferentes tasas de liberación. Tras las mediciones de absorbancia, se obtienen curvas en donde se logra la relación entre concentración acumulada de iones versus absorbancia.

Para la realización de este ensayo, se trabajó con muestras que contenían diferentes porcentajes de nanopartículas de cobre, así como con nanopartículas de cobre sumergidas directamente en agua desionizada. Posteriormente, para medir la

absorbancia a una longitud de onda de 455 [nm], se utilizó una técnica de colorimetría, a través de un espectrofotómetro UV visible, modelo Jenway 6320D, llevándose a cabo mediciones cada 3 horas, el primer y segundo día, así como a las 48 y 96 horas.

A continuación, se describe el procedimiento llevado a cabo para el ensayo de lixiviación con nanocompósitos:

1. Sumergir las muestras en tubos de ensayos plásticos de 50 ml, aforando hasta 40 [ml] con agua desionizada.
2. Para cada medición extraer 3 [ml] de cada muestra en duplicado y colocar en tubos de ensayo plásticos de 15 [ml]. El resto de agua, donde las muestras se sumergen, se desecha y se reemplaza por 40 [ml] de agua desionizada limpia. Adicionalmente, realizar un blanco con 3 [ml] de agua desionizada.
3. A cada muestra y al blanco, agregar 3 [ml] de los siguientes reactivos, en fracciones de 1 [ml] de cada uno, en estricto orden: Hidroxilamina al 10%, Solución Buffer, Neocuproína.
4. Agitar las mezclas y medir absorbancia de todas las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 455 [nm]. Calibrar previamente con el blanco.

Para la medición de liberación de iones cobre, a partir de las nanopartículas sumergidas directamente en el agua desionizada, se aplica el siguiente procedimiento:

1. Pesar cierta cantidad de nanopartículas de cobre (para este trabajo, se masaron 0,05 y 0,025 [g]) y sumergir en tubos de centrífuga, aforando hasta 40 [ml] con agua desionizada.
2. Agitar con la mano cada tubo centrífuga y deja reposar entre cada medición.
3. Centrifugar antes de obtener muestra, bajo las siguientes condiciones: 19.000 [RPM] durante 15 minutos. Esto evita la extracción de nanopartículas de cobre durante las mediciones.
4. Para cada medición extraer 3 [ml] de cada muestra en duplicado y colocar en tubos de ensayo plásticos de 15 [ml]. El resto de agua, donde las muestras se sumergen, se desecha y se reemplaza por 40 [ml] de agua desionizada limpia. Adicionalmente, realizar un blanco con 3 [ml] de agua desionizada.
5. A cada muestra y al blanco, agregar 3 [ml] de los siguientes reactivos, en fracciones de 1 [ml] de cada uno, en estricto orden: Hidroxilamina al 10%, Solución Buffer, Neocuproína.

6. Agitar las mezclas y medir absorbancia de todas las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 455 [nm]. Calibrar previamente con el blanco.

Como se explicara anteriormente, es necesario el acondicionamiento y la preparación de reactivos, los cuales se realizan de la siguiente manera:

1. *Hidroxilamina al 10%*: Se disuelven 10 [gr] de cristales de hidroxilamina en agua desionizada en un matraz de 100 [ml]. Se sella el matraz con un film y se sonica durante 10 minutos, para homogenizar la solución.
2. *Solución Buffer*: Se mezclan 107 [ml] de acetato de sodio con 93 [ml] de ácido acético al 0,1 M, en una probeta de 200 [ml]. La mezcla es agitada durante aproximadamente 20 minutos en agitador magnético.
 - ✓ *Acetato de Sodio 0,1 M*: Se disuelven 6,85 [gr] de acetato de sodio en polvo en agua desionizada en un matraz de 500 [ml]. La mezcla debe ser sonicada por aproximadamente 10 minutos, hasta observar homogeneidad.
 - ✓ *Ácido Acético 0,1 M*: Se disuelven 2,86 [ml] de ácido acético al 100% en agua desionizada en un matraz de 500 [ml].
3. *Neocuproína*: Se disuelven 0,04 [gr] de neocuproína y 10 [ml] de etanol absoluto en agua desionizada en un matraz de 100 [ml]. Se sella el matraz con un film y se sonica durante aproximadamente 20 minutos, hasta observar homogeneidad de la mezcla.

CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIONES

A continuación, se presentan los resultados y las principales discusiones que de ellos se deriven, para cada uno de los nanocompuestos estudiados, tanto desde la perspectiva de viabilidad celular como de la liberación de iones cobre.

V.1. ALGINATO

Con el fin de realizar un análisis lo más acabado posible de los atributos del alginato como biomaterial para uso médico, se llevaron a cabo diversos ensayos, tanto de viabilidad sobre células de corteza cerebral de ratón normal y osteoblastos, así como de liberación de iones cobre. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

V.1.1. Estudio de Viabilidad Celular con células CNh

Para realizar el estudio de viabilidad celular del alginato, en particular para células CNh, inicialmente se estudió la influencia del ion entrecruzante sobre dicha línea celular. A continuación, se llevó a cabo un análisis de la influencia de diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre en el alginato, con la finalidad de determinar la citotoxicidad de este metal sobre las células. Finalmente, se realizó un estudio de adherencia celular hacia el alginato, variando su forma geométrica.

A continuación, se describen los resultados arrojados por los estudios mencionados.

V.1.1.1. Influencia de ion entrecruzante

A partir de la revisión bibliográfica realizada para esta investigación, se pudo concluir que existen diversos iones con los que se puede realizar entrecruzamiento del alginato, entre los cuales se pueden mencionar Ca^{+2} , Ba^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} . Como se estableciera anteriormente, tanto el calcio como el bario presentan similares características en término de fortaleza como entrecruzante [44].

Adicionalmente, parte de la literatura analizada consideraba una característica tóxica del calcio hacia las células. Esto se trató de corroborar analizando la influencia del ion entrecruzante Ca^{+2} , en comparación al ion Ba^{+2} , con el fin de establecer cual de los entrecruzantes favorecía la viabilidad celular, considerando que lo que se busca es biocompatibilidad. De esta manera, se realizaron pruebas del comportamiento celular con dos soluciones: (i) cloruro de calcio y (ii) cloruro de bario, ambos elementos preparados a una concentración de 0,02 [M].

A partir de lo anterior, se prepararon soluciones de alginato puro al 2% p/v y se vertieron gotas de éstas en las soluciones entrecruzantes mencionadas en el párrafo anterior, con la finalidad de realizar el entrecruzamiento necesario para la gelificación esférica de la solución de alginato. En base a las muestras generadas en este procedimiento, se estudió la viabilidad celular por medio del método MTT, depositando las esferas de alginato en las placas de 96 pocillos provistas de células, aplicando el procedimiento descrito en la sección IV.4 de este documento. Los resultados obtenidos a partir de este ensayo, se muestran en el Gráfico V.1.

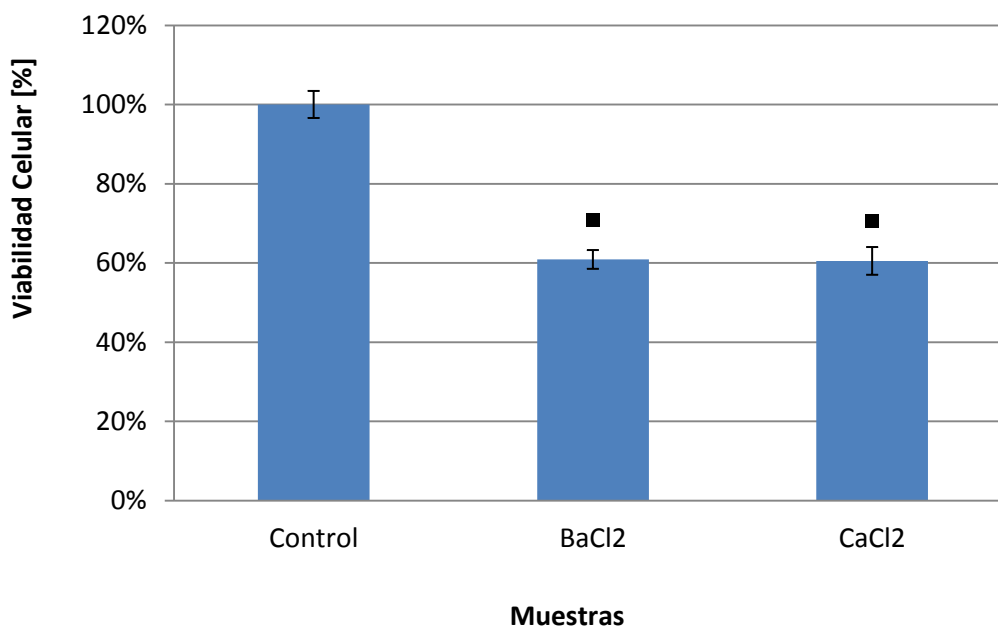


Gráfico V.1: Viabilidad celular por MTT con esferas de alginato para células CNh según medio entrecruzante, solución al 20 [mM]. Datos: Promedio y Desviación Estándar, n=8; (■): valor $p < 0,01$ comparado con el control, utilizando Test de Tukey.

A partir del gráfico anterior, es posible observar una diferencia estadísticamente significativa (valor $p < 0,01$) entre la viabilidad celular de la muestra de control (pocillo sin compuesto polimérico) y las muestras de alginato con diferentes soluciones de entrecruzantes, según lo antes mencionado. En efecto, es posible apreciar una diferencia de aproximadamente 40% en la supervivencia celular, lo cual se podría deber a lo mencionado en la sección III.3.2.1, esto es una baja adherencia celular hacia el alginato, dado su carácter hidrofílico [48].

Adicionalmente, la menor adherencia se podría explicar por la forma esférica de las muestras de alginato estudiadas, lo que disminuiría la superficie de contacto. Más adelante se presentan estudios sobre estos posibles casos.

A pesar de lo anterior, para ambas soluciones de entrecruzamiento, la viabilidad celular no presenta una variación estadísticamente significativa (valor $p > 0,05$)⁵ entre ellas, llegando a un 60% de supervivencia celular. De esta manera, se puede concluir que no existiría efecto del tipo de ion entrecruzante en la viabilidad celular. Sin embargo, en base a lo definido en la sección III.4, puede presentarse una alteración celular al existir una alta concentración extracelular de iones calcio llegando a generar la muerte celular [59]. Por esta razón, la solución entrecruzante de Cloruro de Calcio fue descartada para los ensayos de viabilidad posteriores, ya sea para la misma línea celular (CNh) o para líneas alternativas (SAOS-2) y se optó por continuar trabajando con la solución entrecruzante de Cloruro de Bario.

Cabe destacar que no se realizaron estudios de viabilidad celular con la solución entrecruzante de forma directa, es decir, disolviendo directamente Cloruro de Bario y Cloruro de Calcio, en concentraciones al 0,02 [M], en el medio de cultivo, con el fin de poder determinar si una alteración en el medio extracelular tiene efectos a nivel celular. De esta forma, se deja como un tema para futuras investigaciones realizar estudios que corroboren la información bibliográfica en este aspecto.

Mayor detalle de los resultados mostrados en el Gráfico V.1 y conclusiones estadísticas derivadas, pero no explicitadas en el mismo, pueden ser obtenidos de la Tabla VIII.3 y Tabla VIII.4, que se adjuntan en Anexos.

V.1.1.2. Influencia de iones cobre

De forma similar que para la experiencia anterior, se realizaron muestras de esferas de alginato (al 2% p/v), pero combinadas con diferentes cantidades de nanopartículas de cobre, que variaron entre 1% y 10%, con intervalos de 1%.

Como antes, las muestras fueron depositadas en placas de 96 pocillos y se subcultivaron células CNh sobre ellas, para finalmente realizar el estudio de citotoxicidad por medio del método MTT, según lo explicado en la sección IV.4.

Los resultados obtenidos se muestran en el Gráfico V.2:

⁵ Ver Anexos.

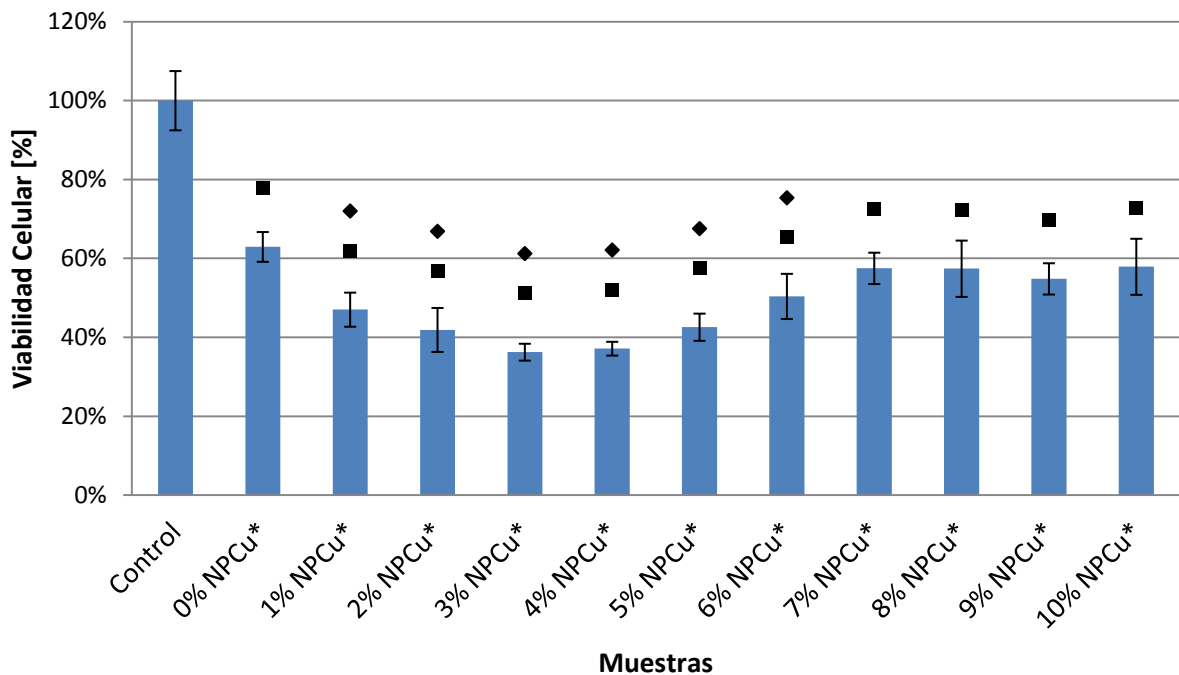


Gráfico V.2: Viabilidad celular por MTT con esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh; (*): Compósito de alginato al 2%. Datos: Promedio y Desviación Estándar, n=6; (■): valor $p < 0.01$ comparado con el control, utilizando Test de Tukey; (▲): valor $p < 0.01$ comparado con el alginato blanco, utilizando Test de Tukey.

A partir del gráfico anterior, se aprecia que para las muestras que contienen entre 1% y 5% de nanopartículas de cobre, la viabilidad celular disminuye de forma estadísticamente significativa (valores $p < 0,01$) a niveles de entre 35% y 47%, respecto a las muestras de control y de alginato puro.

Sin embargo, también se infiere que la viabilidad celular comienza a aumentar a niveles que varían entre 55% y 60%, en la medida que la concentración de nanopartículas de cobre se ubica por sobre el 5%. Esta conclusión se basa en la realización de test de medias de Tukey cruzados, entre las muestras con concentraciones de cobre superiores a 5% y aquellas con una proporción igual o inferior a 5% del metal. En la mayoría de estos casos (84%)⁶, la mayor viabilidad celular para concentraciones de cobre superiores al 5%, resultan estadísticamente significativas (valores $p < 0,05$) con respecto a las muestras con concentraciones de entre 1% y 5%

⁶ Existe un universo (n) de cinco muestras con concentraciones de cobre entre 1% y 5% (ambos valores inclusive), a la vez que hay un universo (m) de cinco muestras con concentraciones de cobre superiores a 5%. Para definir si las muestras del universo "m" presentan promedios de viabilidad celular significativamente distintos y superiores a los del universo "n", se realizan test de media de Tukey cruzados, generando un total de 25 tests (n veces m). De dichos tests cruzados, un total de 21 resultaron estadísticamente significativos a un valor $p < 0,05$, lo que equivale a un 84% del universo de tests analizados.

de cobre. Cabe señalar que en el 72%⁷ de los casos, la significancia estadísticas alcanza valores $p < 0,01$ bajo el mismo test de Tukey⁸.

Pese a lo anterior, los niveles de supervivencia celular para estas concentraciones superiores de cobre, se mantienen de forma estadísticamente significativa por debajo de la viabilidad celular presentada por la muestra de alginato puro (con valores $p < 0,01$, según lo apreciado en el gráfico).

El respaldo y detalle de los resultados expuestos en el Gráfico V.2 y conclusiones estadísticas adicionales, se adjunta la Tabla VIII.5 y Tabla VIII.7, en Anexos.

Los hallazgos mostrados en el Gráfico V.2, difieren de la evidencia empírica mostrada por aquellos estudios mencionados en la sección III.2.2, los cuales concluían que a mayor concentración de cobre, la viabilidad celular disminuía de forma sistemática [7][14][21][24][25][26].

Debido a esto, se realizó un estudio de las mismas muestras, pero esta vez en ausencia de células, con el fin de verificar si existía alguna influencia de los componentes de la esfera de alginato, al momento de realizar el ensayo de viabilidad celular, que pudiesen estar interfiriendo en la lectura de absorbancias.

Los resultados de este estudio se presentan en el Gráfico V.3, donde se aprecian las absorbancias estudiadas para las diferentes muestras de alginato, con y sin células.

⁷ Idem al caso anterior, pero considerando un valor $p < 0,01$, el total de casos significativos se reduce a 18 casos, de un total de 25 (72%).

⁸ Ver Anexos.

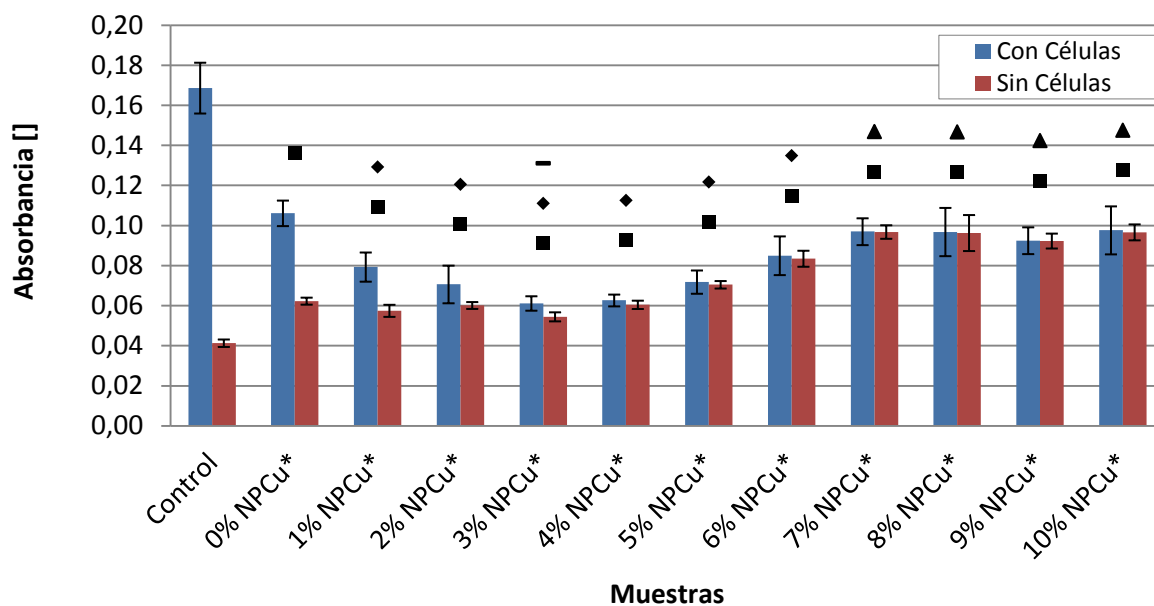


Gráfico V.3: Comparación de absorbancias con esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh; (*): Compósito de alginato al 2%. Datos: Promedio y Desviación Estándar, n=6; (■): valor $p < 0.01$ comparado con el control para muestras con y sin células, utilizando Test de Tukey; (◆): valor $p < 0.01$ comparado con el alginato blanco para muestras con células, utilizando Test de Tukey; (▲): valor $p < 0.01$ comparado con el alginato blanco para muestras sin células, utilizando Test de Tukey; (-): valor $p < 0.05$ comparado con el alginato blanco para muestras sin células, utilizando Test de Tukey.

Del gráfico anterior, se concluye que efectivamente existe una alteración en la lectura de absorbancia con la utilización del alginato por sí sólo. En este sentido, sería esperable que en ausencia de células, la absorbancia no fuera estadísticamente distinta entre la muestra de alginato puro y la muestra de control, lo que demostraría que este biomaterial no estaría generando ningún factor influyente por sí mismo. Al contrario, se aprecia que para muestras sin células, la absorbancia del alginato puro es estadísticamente superior (valores $p < 0,01$) que para el mismo caso de la muestra de control, con lo cual este biomaterial estaría alterando de forma significativa la lectura de absorbancia.

Como complemento a lo anterior, el gráfico permite inferir que esta alteración tiende a amplificarse a medida que el compósito presenta mayores concentraciones de cobre. Si bien, las diferencias de absorbancias no resultan estadísticamente significativas (valores $p > 0,05$) para muestras sin células, respecto al alginato puro, en concentraciones de cobre entre 1% y 6% (excepto para combinación con 3% de cobre, que presenta significancia a valor $p < 0,05$), si lo son cuando las concentraciones de cobre superan el 6%.

Este efecto amplificador del cobre sobre la alteración de absorbancias generada por el alginato puro, para concentraciones de cobre superiores al 6% y combinación al 3%, se corrobora con el hecho que las variaciones de absorbancia entre las muestras con y sin células tienden a disminuir en la medida que aumenta la concentración del metal, apreciándose diferencias no significativas desde el punto de vista estadístico (valores $p > 0,05$)⁹. Al contrario, para la muestra de alginato puro y aquella en combinación con 1% de cobre, las diferencias de absorbancias entre los casos con y sin células resultan estadísticamente significativas (valores $p < 0,01$).

La información presentada en el Gráfico V.3 y conclusiones estadísticas adicionales, se pueden encontrar en Tabla VIII.6, Tabla VIII.7 y Tabla VIII.8, que se adjuntan en Anexos.

Lo anterior demuestra que efectivamente existen factores que alteran la medición de viabilidad celular. Si bien, inicialmente el alginato puro parece generar una alteración importante, un análisis más detallado permitió concluir que la concentración de cobre potencia este efecto, llegando incluso a ser más relevante, por cuanto no se observan diferencias significativas en absorbancias entre muestras – con y sin células – con mayor concentración del metal.

Dados los indicios anteriores, se optó por generar diferencias (sustracción) del valor de las absorbancias, con la finalidad de obtener la viabilidad celular efectiva que existe para este tipo de sustrato y, de esta forma, asegurar que la lectura de absorbancia estuviese sólo asociada a células vivas. Dichos resultados son presentados en el Gráfico V.4.

⁹ Ver Anexos.

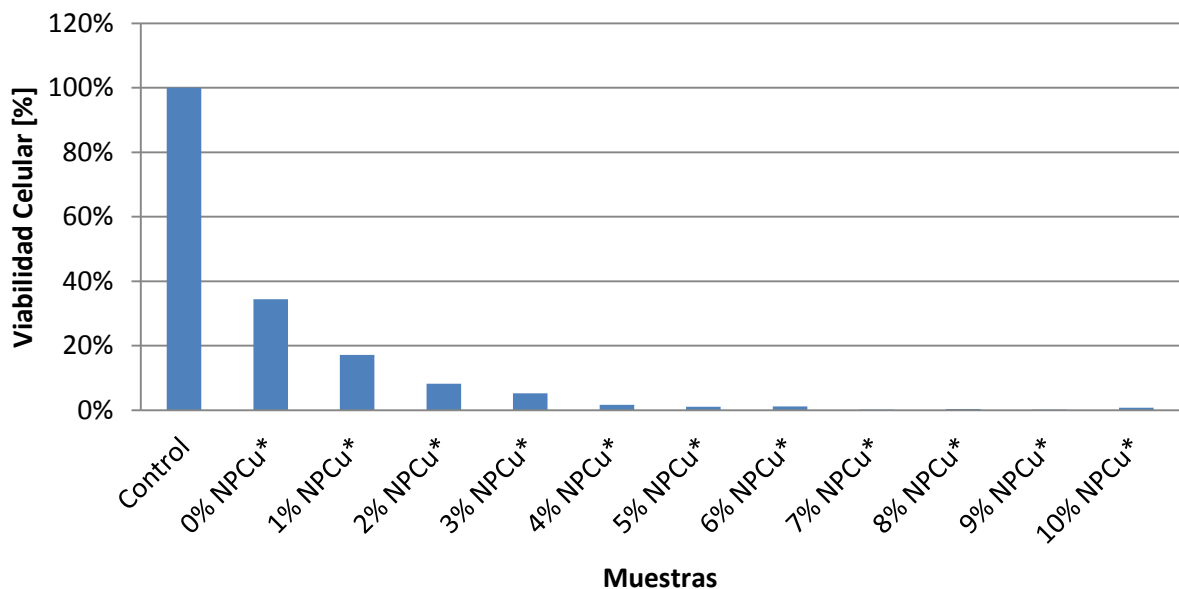


Gráfico V.4: Viabilidad celular por MTT corregida con esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh; (*) Compósito de alginato al 2%.

El gráfico anterior permite establecer una relación negativa entre viabilidad celular y concentraciones de nanopartículas de cobre. Esto es, mientras mayor es la concentración de cobre en las muestras de alginato, menor es la viabilidad celular. En particular, se puede observar que para muestras con concentraciones mayores al 1% de nanopartículas de cobre, existe una viabilidad celular bajo el 8%, tendiendo a cero a partir de concentraciones del metal, superiores a 6%. Esto permite inferir toxicidad de los iones cobre hacia la línea celular. Por su parte, para la muestra de alginato puro, la viabilidad disminuye casi a la mitad de lo presentado en el Gráfico V.2, desde 60% a 30%, aproximadamente. Respecto a este último punto, en el proceso de revisión bibliográfica no se encontró información de experimentos de alginato basados en MTT, comparables en alcance y metodología, que permitieran rebatir o ratificar este hallazgo, el cual en parte podría también explicarse por posibles impurezas presentes en el alginato.

Los resultados anteriores pueden observarse detalladamente en la Tabla VIII.5 que se adjunta en Anexos.

En base a los bajos niveles de viabilidad observados en el gráfico anterior, se decidió estudiar si la forma geométrica del nanocompuesto pudiera estar afectando la viabilidad celular. Se debe recordar, que las pruebas de alginato realizadas hasta este punto de la investigación, se basan en muestras de forma esférica, lo que podría afectar la adherencia celular en el alginato. Por lo anterior, se decidió experimentar con discos de alginato, similares a los utilizados con TEGMA/BisGMA, esperando que ellos

proveyeran una mayor superficie de contacto efectiva, lo que debiese facilitar la adherencia celular.

Esta hipótesis está en línea con lo mencionado en la sección III.3.2.1, donde se establece que el alginato presenta baja adherencia celular, debido a su carácter hidrofílico [48].

Las pruebas de influencia de la morfología del nanocompósito, se presentan a continuación.

V.1.1.3. Influencia de la geometría de nanocompósito en la adherencia celular

Con el fin de verificar la adherencia celular en las muestras de alginato, las mismas fueron preparadas en forma de discos, de tal forma de disminuir la superficie de contacto con los pocillos donde se realizan los ensayos, considerando además que las células tienden a decantar con el tiempo.

Al igual que para el caso de esferas de alginato, se apreciaron diferencias estadísticamente significativas (valores $p < 0,01$) entre muestras de discos de alginato con y sin cobre, en comparación a la muestra de control, ya fuera en presencia o ausencia de células. Por lo tanto, este biomaterial – ahora con una morfología de nanocompósito distinta (disco) – continuaría generando alteraciones sobre la lectura de absorbancia.

La información discutida recientemente y conclusiones estadísticas adicionales, se presentan en Tabla VIII.9, Tabla VIII.10, Tabla VIII.11 y Tabla VIII.12, que se adjuntan en Anexos.

En función de lo anterior, y al igual que en el estudio de viabilidad celular realizado para las esferas de alginato, se llevó a cabo un análisis de diferencias (sustracción) del valor absoluto de absorbancias, con el fin de determinar la viabilidad celular efectiva que existe para este tipo de sustrato y, de esta forma, asegurar que la lectura de absorbancia estuviera sólo asociada a células vivas. Dichos resultados son presentados en el Gráfico V.5, a continuación.

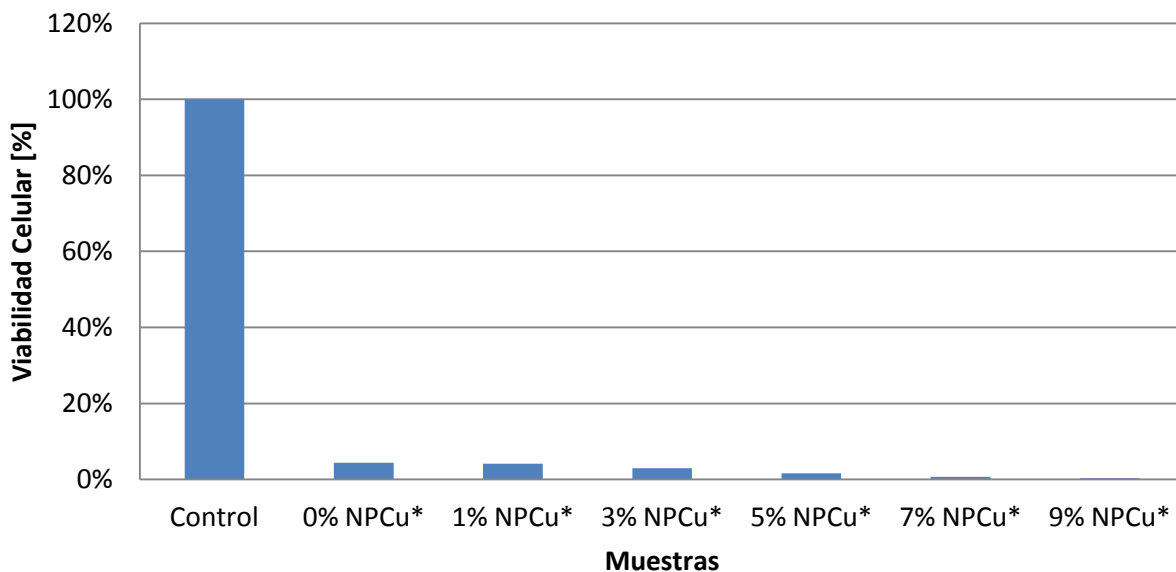


Gráfico V.5: Viabilidad celular por MTT corregida con discos de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh; (*): Compósito de alginato al 2%.

El gráfico anterior permite observar una reducción considerable en la viabilidad celular para cualquier muestra de alginato estudiada, independiente de los niveles de cobre. En efecto, todas las muestras presentan niveles de viabilidad celular por debajo de 4,5%, llegando en algunos casos al 0%.

Los resultados anteriores pueden observarse detalladamente en la Tabla VIII.9 que se adjunta en Anexos.

Estos resultados permiten demostrar que a pesar de que los discos de alginato, en comparación a la morfología de esferas, generan una mayor área de contacto para este biomaterial y disminuyen el área de la base de pocillos donde se realizan las pruebas de citotoxicidad, no generan mejores resultados de viabilidad celular.

Lo anterior puede ser corroborado mediante una comparación de la supervivencia celular de esferas y discos de alginato, la cual se observa en el Gráfico V.6, a continuación.

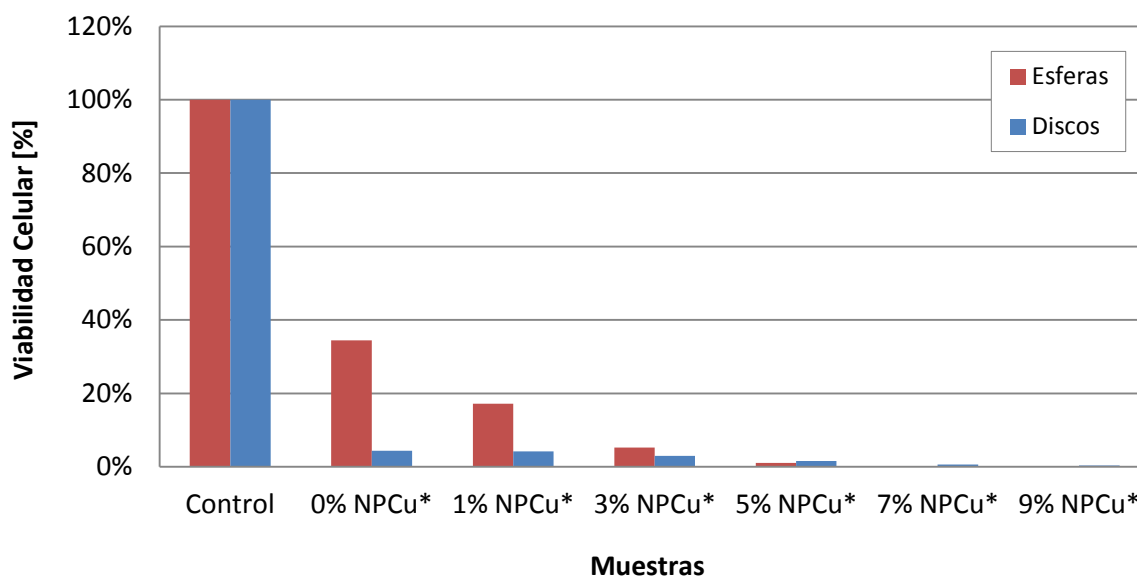


Gráfico V.6: Comparación de viabilidad celular por MTT corregida de alginato con diferentes geometrías y concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh; (*) Compósito de alginato al 2%.

En efecto, los resultados presentados en el gráfico anterior permiten observar una disminución de la viabilidad celular cuando el alginato es preparado en forma de disco en relación a una morfología de esfera, lo que rebate la tesis de que una mayor superficie de contacto debiese generar una mayor supervivencia celular. Estos hallazgos permitirían concluir la existencia de una baja – y en algunos casos prácticamente nula – adherencia celular al alginato.

Esto se puede deber a que al mismo tiempo que se realiza la optimización del área de contacto efectiva del alginato, se disminuye la superficie expuesta de los pocillos en los cuales se realizan los ensayos, generando así que el área óptima para adherencia celular, con muestras de discos, se vea reducida en comparación a las muestras de alginato esféricas.

Desde este punto de vista, se puede descartar que la geometría o morfología del nanocompósito sea un factor determinante en la adherencia celular, la cual es baja y en algunos casos nula. Con esto, es posible concluir que el hidrogel de alginato, independiente de su presentación, es el que presenta una baja adherencia, impactando negativamente la viabilidad de las células. Adicionalmente, esto también podría explicarse por posibles impurezas presentes en el alginato.

No obstante lo anterior, se considera que futuros estudios podrían analizar la adherencia celular mediante el método de modificación covalente del alginato, que se explicara en la sección III.3.2.1 [43].

La comparación de los resultados observados en el Gráfico V.6 se pueden analizar detalladamente en Tabla VIII.5 y Tabla VIII.9, las cuales se presentan en Anexos.

V.1.2. Estudio de Viabilidad Celular con células SAOS-2

Debido a la poca evidencia empírica a nivel nacional e internacional, respecto de la biocompatibilidad del alginato, y a la conclusión obtenida en el análisis anterior, respecto a la no adherencia de la línea celular CNh hacia el hidrogel de alginato, se decidió probar su interacción con una línea celular adicional de tipo adherente, como SAOS-2.

De esta forma, se realizaron ensayos tendientes a determinar la influencia de diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre en el alginato, con la finalidad de establecer la citotoxicidad de este metal sobre células SAOS-2. Así, en línea con lo antes realizado, se trabajó sólo con muestras de alginato en forma esféricas (al 2% p/v), en combinación con distintas concentraciones de nanopartículas de cobre, que variaron entre 1% y 9%, con intervalos de 2%.

Nuevamente, las muestras fueron depositadas en placas de 96 pocillos y se subcultivaron células SAOS-2 sobre ellas, para finalmente analizar la citotoxicidad por medio del método MTT, según lo explicado en la sección IV.4.

A partir de los ensayos realizados, se apreció que el comportamiento de la línea SAOS-2, es similar al observado para células CNh. En efecto, se establece una alteración estadísticamente significativa en la lectura de absorbancia para las diferentes muestras, infiriendo que el alginato por sí sólo presenta un efecto influyente en dicha lectura. Así, este biomaterial estaría generando alguna alteración significativa en la lectura de absorbancia para la línea celular SAOS-2, al igual que para la CNh.

Como complemento a lo anterior, esta alteración tiende a amplificarse en la mayoría de los casos, a medida que el nanocompósito presenta mayor concentración de cobre. En efecto, para muestras sin células, las absorbancias de las muestras con distintas concentraciones de cobre difieren significativamente (valores $p < 0,05$), de aquella asociada a la muestra de alginato puro (sin células).

El respaldo y detalle de los resultados y conclusiones estadísticas adicionales, se adjuntan en Tabla VIII.13, Tabla VIII.14, Tabla VIII.15 y Tabla VIII.16, presentes en Anexos.

Al igual que para la línea celular CNh, lo anterior demuestra que para células SAOS-2 existen factores que alteran la medición de viabilidad celular, por lo que se

decidió generar diferencias (sustracción) del valor absoluto de las absorbancias, con la finalidad de determinar la viabilidad celular efectiva que existe para este tipo de sustrato y, de esta forma, asegurar que la lectura de absorbancia estuviese sólo asociada a células vivas SAOS-2. Dichos resultados son presentados en el Gráfico V.7.

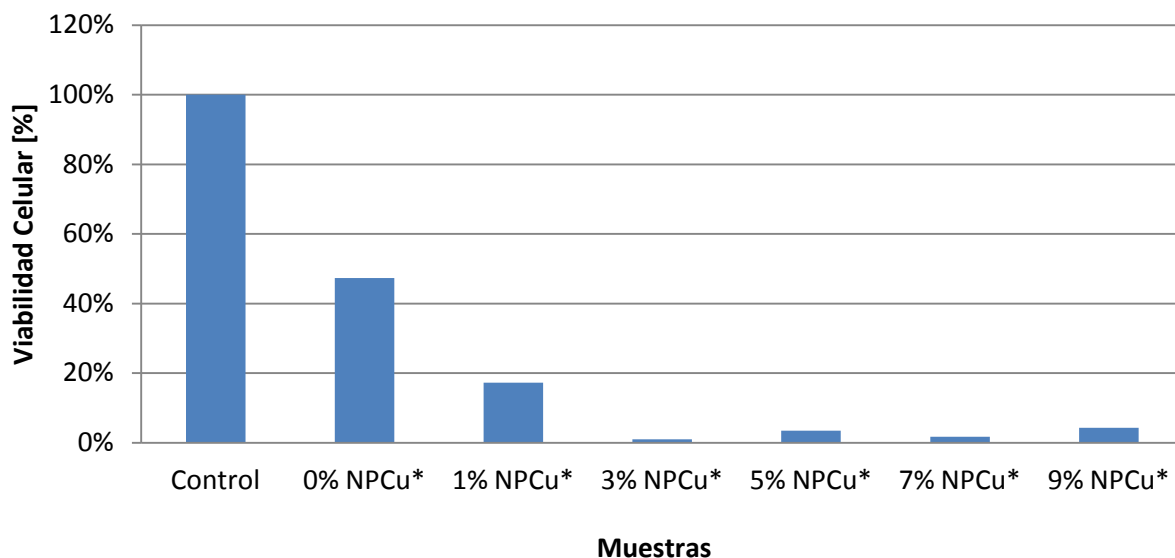


Gráfico V.7: Viabilidad celular por MTT corregida con esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2; (*): Compósito de alginato al 2%.

El gráfico anterior permite establecer una relación inversa entre viabilidad celular y concentraciones de nanopartículas de cobre. Esto es, mientras mayor es la concentración de cobre en las muestras de alginato, menor es la viabilidad celular. En particular, se puede observar que para muestras con concentraciones mayores al 1%, existe una viabilidad celular menor al 4,5%, en algunos casos tendiendo a cero, a mayores concentraciones de cobre. De esta manera, se podría inferir que el cobre estaría siendo tóxico para la línea SAOS-2, al igual que para la línea CNh.

Los resultados anteriores pueden observarse detalladamente en la Tabla VIII.13, que se adjunta en Anexos.

Se debe destacar que para la línea SAOS-2 no se realizaron pruebas de adherencia celular, a través de modificaciones en la forma geométrica del hidrogel de alginato, debido a que en el análisis previo para la línea CNh se concluyó que a partir de las características del alginato, las células CNh presentaron una baja adherencia.

V.1.3. Comparación de Estudio de Viabilidad Celular

Luego de realizar un análisis del comportamiento de las líneas celulares CNh y SAOS-2 por separado, se decidió llevar a cabo una comparación de los resultados obtenidos, para determinar la influencia del nanocompósito de alginato en forma más detallada. Dicho estudio, se aprecia en el Gráfico V.8:

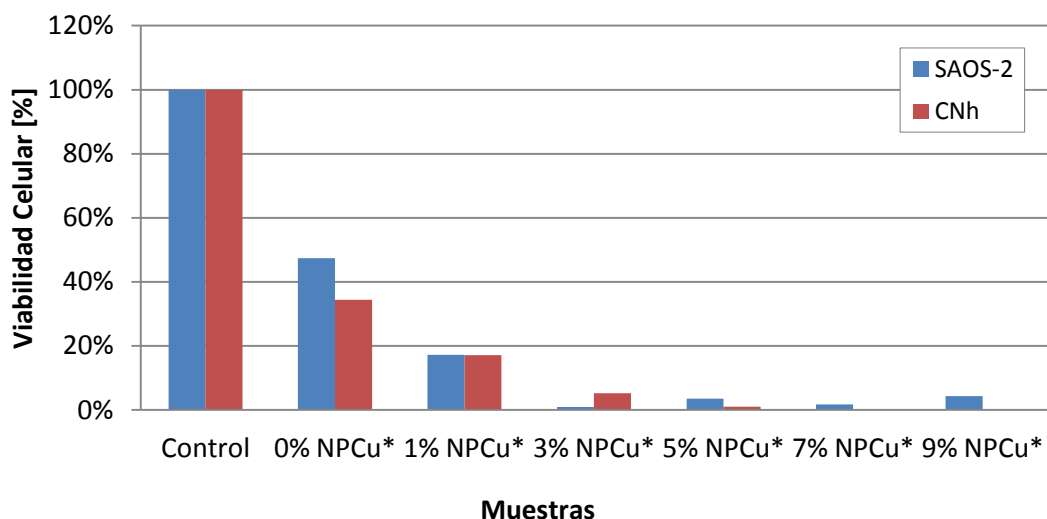


Gráfico V.8: Comparación de viabilidad celular por MTT corregida de alginato con nanopartículas de cobre para células CNh y SAOS-2; (*): Compósito de alginato al 2%.

A partir del gráfico anterior, se aprecia que ambas líneas celulares presentan una disminución importante de viabilidad, en la medida que se incremente la concentración de cobre en las muestras de alginato, por sobre un 1%.

Los resultados presentados en el gráfico anterior se encuentran en Tabla VIII.5 y Tabla VIII.13, adjuntas en Anexos.

En base a los análisis realizados en la sección V.1.1.2 y la presente, es posible concluir que la viabilidad celular de las dos líneas estudiadas (CNh y SAOS-2) estaría influenciada, no solo por la ya mencionada baja adherencia del alginato, sino que a su vez por una mayor presencia de nanopartículas de cobre. Además, esto último generaría mayor impacto en las mediciones, provocando toxicidad sobre las líneas celulares investigadas.

V.1.4. Estudio de Liberación de iones cobre

Con la finalidad de confirmar si efectivamente las muestras con mayor concentración de cobre, presentan mayor liberación del mismo, se realizaron estudios de lixiviación de iones de este metal al disolvente.

Los resultados de lixiviación de iones cobre se muestran en el Gráfico V.9:

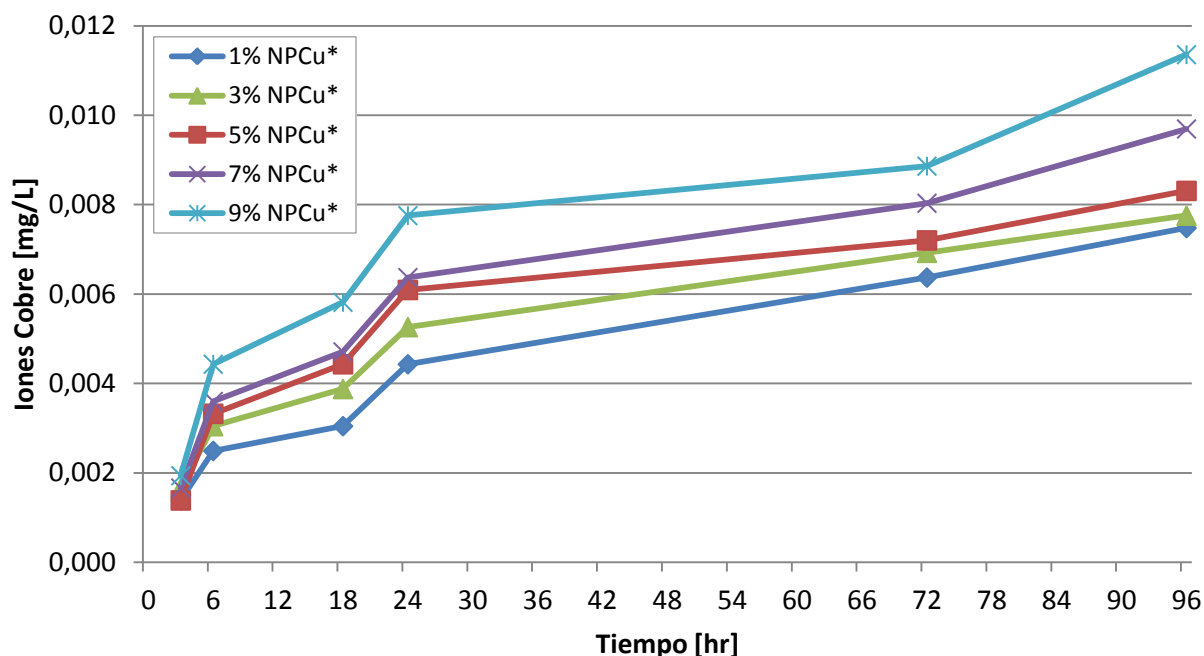


Gráfico V.9: Lixiviación corregida¹⁰ de iones cobre [mg/L] desde esferas de alginato con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr]; (*): Compósito de alginato al 2%.

Desde el gráfico anterior, se puede apreciar que la lixiviación de iones cobre está directamente relacionada con la concentración de nanopartículas de cobre que presenta el nanocompósito en estudio, lo cual demuestra que los nanocompuestos con mayor concentración de cobre presentan mayor citotoxicidad sobre cualquier línea celular estudiada.

Al realizar una comparación a las 24 horas con los resultados de viabilidad celular, la toxicidad podría observarse cuando la lixiviación de iones cobre supera 0,005

¹⁰ Al igual que en los ensayos de viabilidad celular, la muestra de alginato puro presentó algún tipo de lixiviación, por lo cual se debió realizar una diferencia en los valores obtenidos para cada una de las muestras, con la finalidad de obtener sólo la lectura de absorbancia de la liberación de iones cobre.

[mg/L], lo cual se presenta en el gráfico anterior para el caso de las matrices de alginato con concentraciones de nanopartículas de cobre mayores a 1%¹¹.

Para un mayor detalle de los resultados expuestos anteriormente, se puede ver la Tabla VIII.17, adjunta en Anexos.

Adicionalmente, se realizó el estudio de la tasa de liberación de iones cobre para las diferentes muestras analizadas. Dicho estudio se presenta en el Gráfico V.10, a continuación.

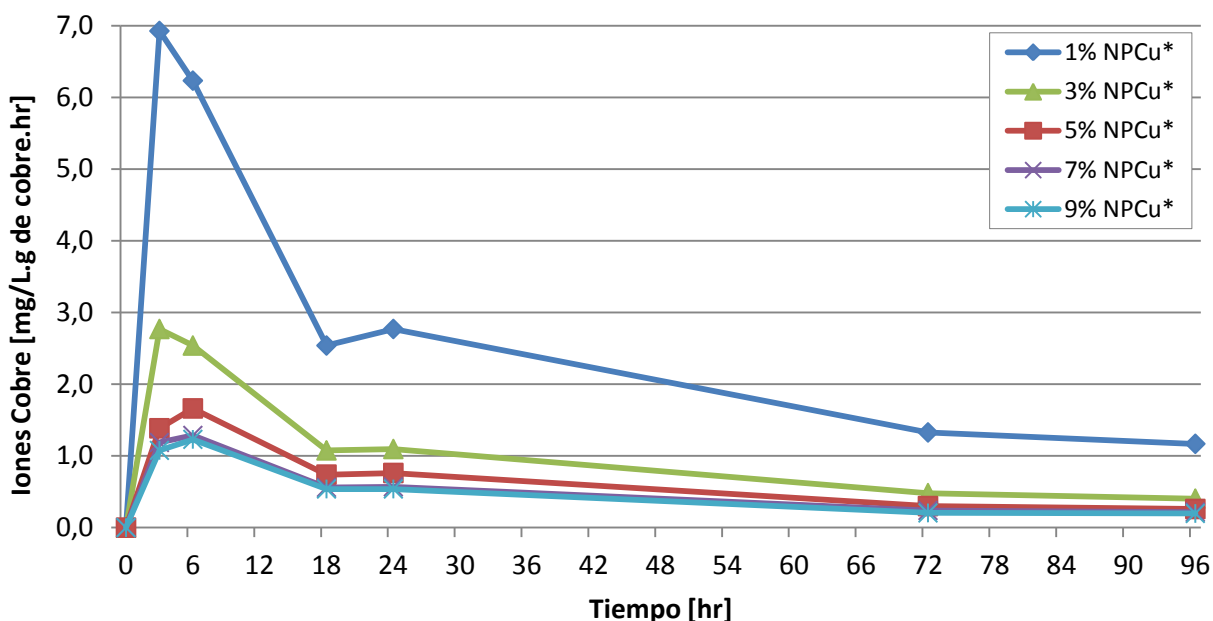


Gráfico V.10: Tasa de liberación corregida¹² de iones cobre [mg/L.g de NPCu.hr] desde esferas de alginato con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr]; (*): Compósito de alginato al 2%.

El gráfico presentado permite observar un peak de liberación normalizada de iones a las 3 horas para cualquier muestra. Para un mayor detalle de los resultados expuestos en el Gráfico V.10, se puede ver en la Tabla VIII.18, adjunta en Anexos.

¹¹ Para determinar la característica tóxica del nanocompósito, se estableció un umbral de supervivencia tomando como base 100% la viabilidad mostrada a las 24 horas por la muestra de alginato puro. Luego, como es estándar en estudios de este tipo, se estableció toxicidad en la medida que la supervivencia de cualquier muestra estuviera por debajo del 50% del nivel presentado por el alginato puro.

¹² Idem al caso anterior.

V.2. ALGINATO SECO

De manera adicional a los estudios de viabilidad celular para células CNh y SAOS-2 con hidrogel de alginato, también se realizaron análisis de viabilidad para la línea celular SAOS-2 con alginato seco¹³ y de liberación de iones cobre desde dichas muestras, para concentraciones de 1% y 5% de dicho metal.

V.2.1. Estudio de Viabilidad Celular con células SAOS-2

Como se mencionara anteriormente, y de forma similar a lo antes realizado, se trabajó sólo con muestras de alginato secas (al 2% p/v), en combinación con distintas cantidades de nanopartículas de cobre, con un 1% y 5% de NPCu, para estudiar la influencia de este ion sobre la supervivencia de la línea celular SAOS-2. Para esto, las muestras fueron depositadas en placas de 96 pocillos, subcultivándose células SAOS-2 sobre ellas, para finalmente realizar el estudio de citotoxicidad por medio del método MTT, según lo explicado en la sección IV.4.

A partir de los resultados obtenidos del análisis, se aprecia que para las muestras que contienen nanopartículas de cobre, la viabilidad celular disminuye de forma estadísticamente significativa (valores $p < 0,01$) a niveles cercanos al 40%, respecto a las muestras de control y de alginato puro. Sin embargo, a partir de cierta concentración de cobre en adelante, la viabilidad comenzó a aumentar, lo que coincide con lo observado para el hidrogel de alginato.

En base a los resultados observados, se realizó un estudio de las mismas muestras pero sin células determinándose nuevamente alteraciones en las lecturas de absorbancias.

En efecto, al igual que para estudios anteriores, se observa que el alginato por sí sólo – esta vez en estado puro – presenta un efecto influyente en este ámbito, apreciándose una absorbancia estadísticamente superior (valores $p < 0,01$) del alginato seco puro, respecto a la muestra control. Así, este biomaterial en estado seco, estaría nuevamente generando alteraciones estadísticamente significativas en la lectura de absorbancia, la cual se mantiene (valores $p < 0,05$) a medida que el compuesto incorpora nanopartículas de cobre, para muestras sin células, respecto al alginato puro.

La información y conclusiones estadísticas adicionales presentadas, se pueden encontrar en Tabla VIII.19, Tabla VIII.20, Tabla VIII.21 y Tabla VIII.22, que se adjuntan en Anexos.

¹³ Esferas de alginato secadas a temperatura ambiente durante cuatro a cinco días.

En base a lo anterior, se optó por generar diferencias (sustracción) del valor de las absorbancias, con la finalidad de obtener la viabilidad celular efectiva que existe para este tipo de sustrato y, de esta forma, asegurar que la lectura de absorbancia estuviese sólo asociada a células vivas. Dichos resultados son presentados en el Gráfico V.11.

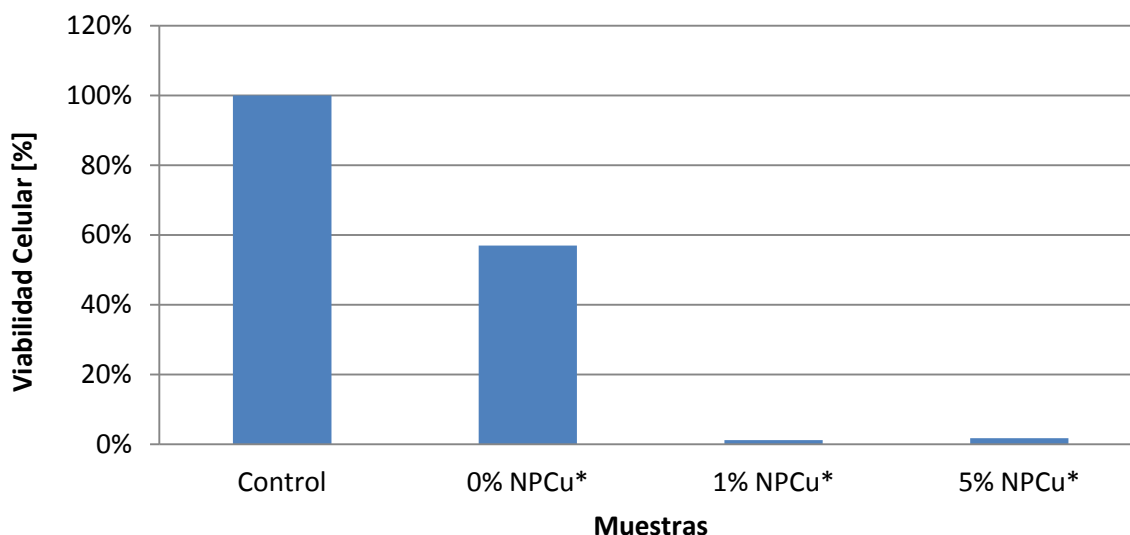


Gráfico V.11: Viabilidad celular por MTT corregida con esferas de alginato seco a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2; (*): Compósito de alginato seco al 2%.

El gráfico anterior permite establecer una relación negativa entre viabilidad celular y concentración de nanopartículas de cobre. En particular, se observa que para muestras con concentraciones mayores al 1% de nanopartículas de cobre, existe una viabilidad celular menor a 2%, por lo que el cobre estaría generando toxicidad sobre la línea celular SAOS-2.

Los resultados anteriores pueden observarse detalladamente en la Tabla VIII.19 que se adjunta en Anexos.

V.2.2. Estudio de Liberación de Iones Cobre

Con la finalidad de confirmar si efectivamente las muestras con mayor concentración de cobre, presentan mayor liberación del mismo, se realizaron estudios de lixiviación de iones de este metal al disolvente. Los resultados se muestran en el Gráfico V.12.

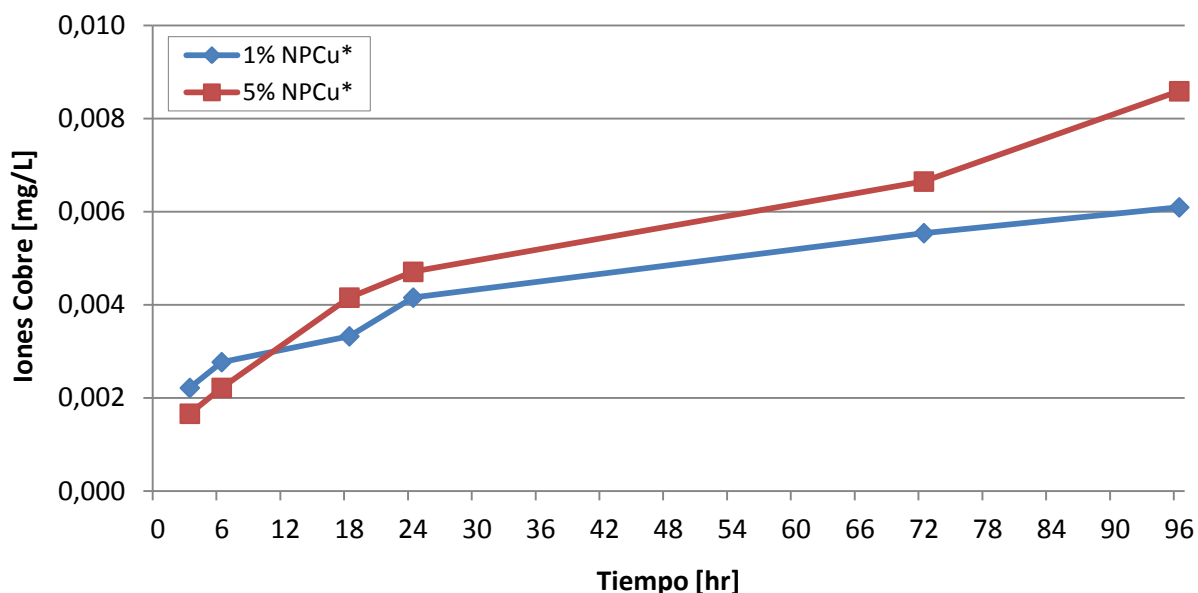


Gráfico V.12: Lixiviación corregida¹⁴ de iones cobre [mg/L] desde alginato seco con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr]; (*): Compósito de alginato seco al 2%.

A partir del gráfico anterior, se puede inferir que la lixiviación de iones cobre estaría directamente relacionada con el nivel de concentración del metal en el nanocompósito bajo estudio. Ambas muestras tienen un comportamiento similar, no apreciándose una diferencia estadísticamente significativa entre ellas, lo que corrobora la toxicidad anteriormente señalada. Para mayor detalle de estos resultados, se sugiere ver Tabla VIII.23 que se adjunta en Anexos.

Cabe destacar, que al igual que para el caso del hidrogel de alginato, la muestra de alginato seco puro presentó cierto grado de lixiviación, por lo cual se realizó una diferencia (sustracción) de los valores obtenidos para cada muestra, con la finalidad de determinar la lectura de absorbancia de la liberación de iones cobre, por sí sola.

Adicionalmente, se estudió la tasa de liberación de iones cobre en las diferentes muestras de alginato seco, tal como se muestra en el Gráfico V.13.

¹⁴ Cabe destacar que al igual, que para el caso del alginato sin secar, la muestra de alginato seco puro presentó cierto grado de lixiviación, por lo cual se realizó una diferencia (sustracción) de los valores obtenidos para cada muestra, con la finalidad de determinar la lectura de absorbancia de la liberación de iones cobre, por sí sola.

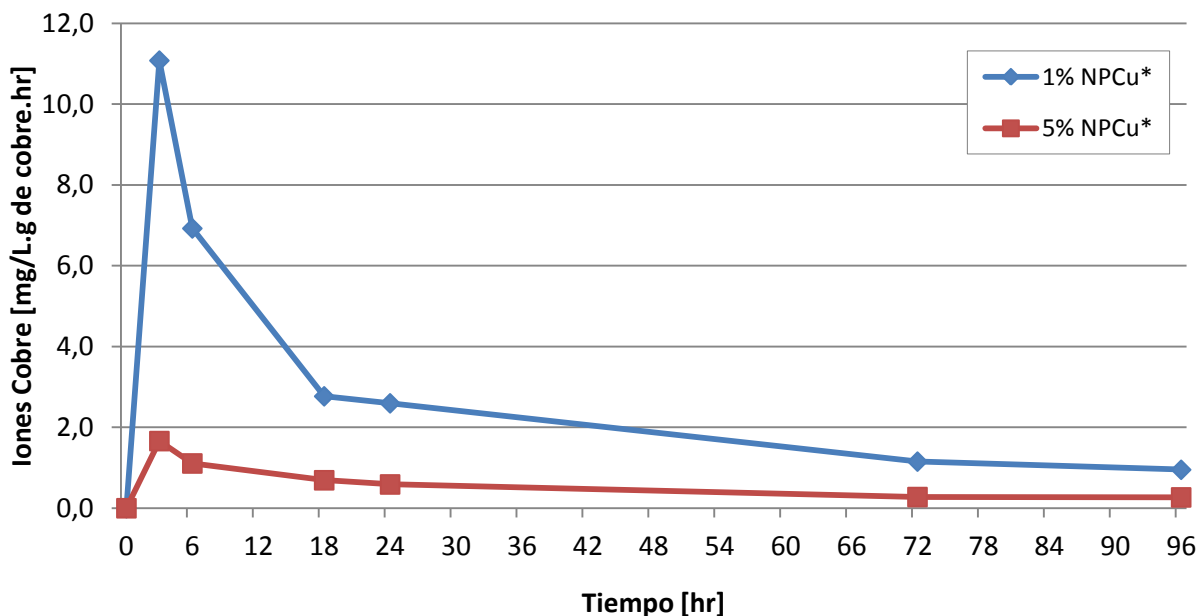


Gráfico V.13: Tasa de liberación corregida¹⁵ de iones cobre [mg/L.g de NPCu.hr] desde alginato seco con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr]; (*): Compósito de alginato seco al 2%.

Como se aprecia en el gráfico, existe un peak de la liberación normalizada en un lapso de tres horas, para cualquier muestra. A partir de dicho punto, la liberación de iones cobre comienza a disminuir asintóticamente. Para mayor ahondamiento en estos resultados, se sugiere ver Tabla VIII.24, que se adjunta en Anexos.

V.3. TEGMA/BISGMA

Otro nanocompósito estudiado durante este trabajo fue el copolímero TEGMA/BisGMA. Al igual que para el alginato, se realizaron ensayos de citotoxicidad sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh), además de pruebas de liberación de iones cobre.

V.3.1. Estudio de Viabilidad Celular con células CNh

Para realizar el estudio de viabilidad celular del TEGMA/BisGMA, se prepararon discos de este copolímero, en combinación con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre (0,5% y 1%, respecto al monómero utilizado).

Al igual que para el alginato, los nanocompósitos de TEGMA/BisGMA fueron depositados en placas de 96 pocillos y se subcultivaron células CNh sobre ellas, para

¹⁵ Idem al caso anterior.

finalmente realizar el estudio de citotoxicidad por medio del método MTT, según lo explicado en la sección IV.4.

Lo anterior permitió establecer que existe un comportamiento no estadísticamente (valores $p > 0,05$)¹⁶ distinto en viabilidad celular para el blanco del copolímero y las muestras con nanopartículas de cobre. Sin embargo, todas las muestras presentaron diferencias de viabilidad estadísticamente significativas (valores $p < 0,01$) respecto a la muestra control, con niveles de supervivencia del 30%.

En base a estos resultados, y como fuera mencionado en la sección III.3.2.2, se consideró que la toxicidad podría deberse a la cantidad de monómero que queda presente tras una polimerización incompleta. Para analizar este efecto, se realizó un estudio de las mismas muestras, pero esta vez en ausencia de células, con el fin de verificar si existía interferencia de los componentes de los discos de TEGMA/BisGMA en la lectura de absorbancia, al momento de realizar el ensayo de viabilidad celular.

A partir de lo anterior, se obtuvo una alteración en la lectura de absorbancia con la utilización del TEGMA/BisGMA por sí sólo, apreciándose de esta forma que para muestras sin células, la absorbancia del TEGMA/BisGMA puro es estadísticamente superior (valores $p < 0,01$) que para el mismo caso de la muestra de control. Con esto el biomaterial estaría alterando de forma significativa la lectura de absorbancia.

Esto fue reafirmado por la existencia de una alteración estadísticamente no significativa (valores $p > 0,05$)¹⁷ para muestras con cobre respecto al compuesto puro.

El respaldo y detalle de los resultados y conclusiones estadísticas adicionales, se pueden encontrar en Tabla VIII.26, Tabla VIII.27, Tabla VIII.28 y Tabla VIII.29, que se adjuntan en Anexos.

Lo anterior demuestra que existen factores que afectan la medición de viabilidad celular para el TEGMA/BisGMA. Por lo tanto, queda propuesto para futuros análisis, realizar estudios de viabilidad celular vertiendo los monómeros directamente en el medio celular, para probar citotoxicidad.

Dadas viabilidades celulares similares entre muestras con y sin células para compósitos de TEGMA/BisGMA, estadísticamente no significativas entre ellas, se optó por generar diferencias (sustracción) del valor de las absorbancias, con la finalidad de obtener la viabilidad celular efectiva que existe para este tipo de sustrato y, de esta forma, asegurar que la lectura de absorbancia estuviese sólo asociada a células vivas. Dichos resultados son presentados en el Gráfico V.14.

¹⁶ Ver Anexos.

¹⁷ Ver Anexos.

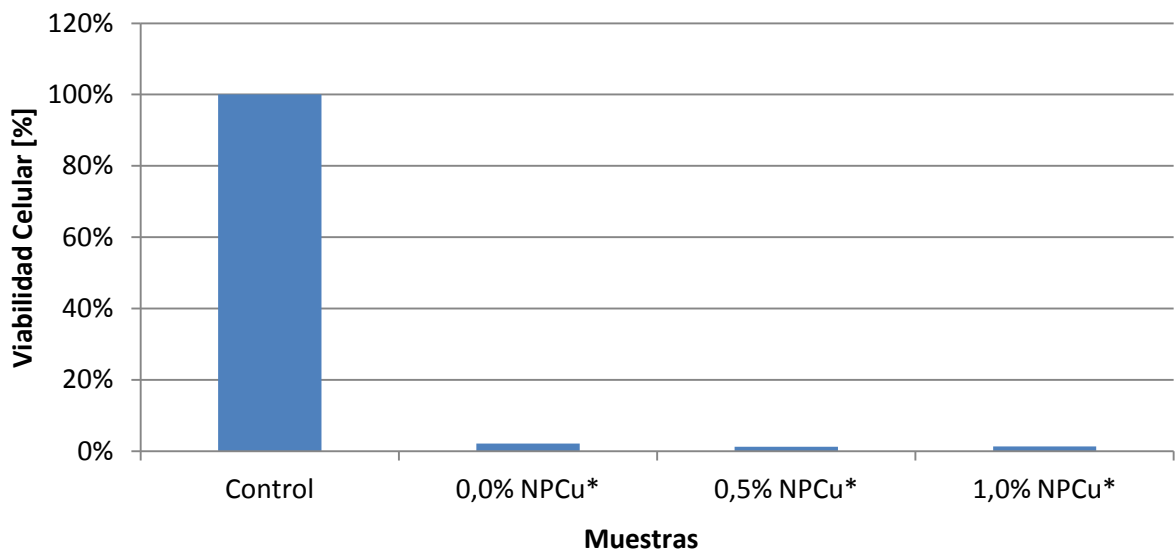


Gráfico V.14: Viabilidad celular por MTT corregida con discos de TEGMA/BisGMA a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh; (*): Compósito de TEGMA/BisGMA.

El gráfico anterior permite establecer que la alteración no estaría asociada a la concentración de cobre, sino más bien a la presencia de monómero residual no polimerizado, el que provocaría toxicidad como fue mencionado en la sección III.3.2.2 [52][54]. En particular, se puede observar que para cualquier muestra (con o sin cobre), existe una viabilidad celular bajo el 2%, en algunos casos tendiendo a cero.

Los resultados anteriores pueden observarse detalladamente en la Tabla VIII.26, que se adjunta en Anexos.

Cabe señalar que, debido a que se concluyó una alta toxicidad para todas las muestras de TEGMA/BisGMA, independiente de la presencia o no de cobre, se descartó el mismo estudio para la línea celular SAOS-2. Dada la escasa evidencia empírica respecto a la toxicidad del TEGMA/BisGMA, estos hallazgos no pueden ser rebatidos o ratificados a la luz de la misma.

V.3.2. Estudio de Liberación de Iones Cobre

Al igual que para los nanocompuestos de alginato, en aquellos de TEGMA/BisGMA, surge la idea de realizar un estudio de lixiviación de iones cobre al disolvente, a pesar que este componente no se considera altamente tóxico en el estudio de viabilidad celular.

Los resultados de lixiviación de iones cobre se muestran en el Gráfico V.15.

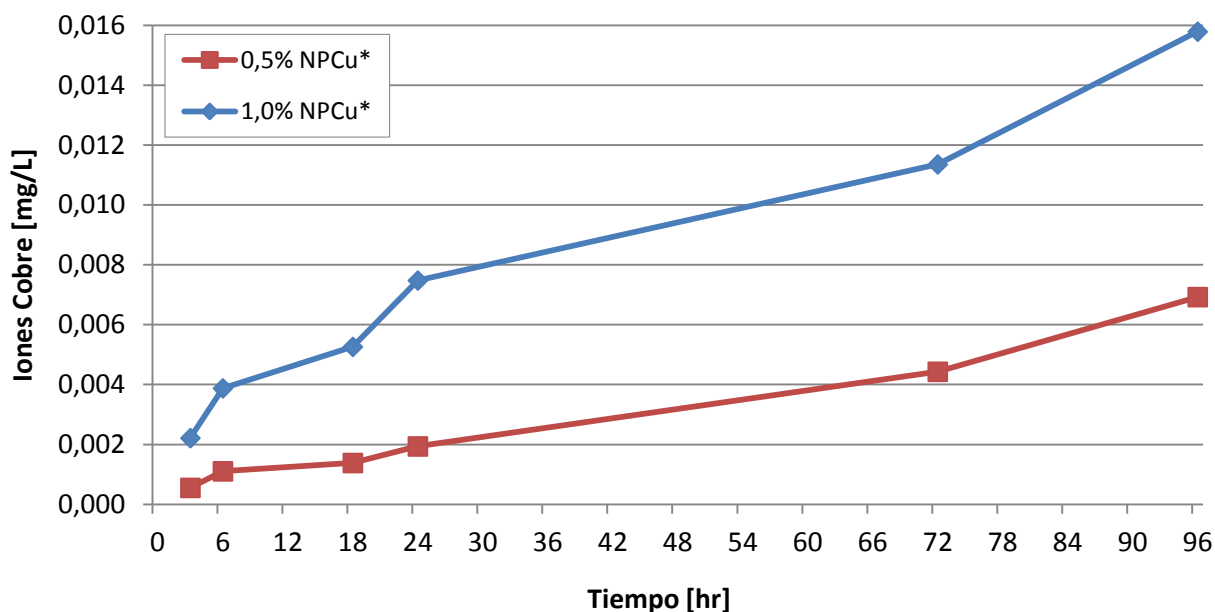


Gráfico V.15: Lixiviación corregida¹⁸ de iones cobre [mg/L] desde TEGMA/BisGMA con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr]; (*): Compósito de TEGMA/BisGMA.

A partir del gráfico anterior, se puede apreciar que la lixiviación de iones cobre está directamente relacionada con la concentración de nanopartículas de cobre que presenta el nanocompósito en estudio. A pesar de esto, la viabilidad celular observada y analizada anteriormente, no puede ser comparada con estos resultados, ya que la citotoxicidad no presenta diferencias estadísticas significativas (valores $p > 0,05$ ¹⁹, según lo analizado anteriormente) entre las muestras con 0,5% NPCu y 1% NPCu, presentándose ambas por debajo del 1,5% de viabilidad celular.

Mayor detalle de los resultados, se puede ver en Tabla VIII.30, que se presenta adjunta en Anexos.

No se debe dejar de mencionar, que al realizar el estudio de la liberación de iones cobre, también se puede estudiar la tasa de liberación de estos en las diferentes muestras analizadas. Dicho estudio se presenta en el Gráfico V.16, a continuación.

¹⁸ Al igual que en los ensayos de viabilidad celular, la muestra de TEGMA/BisGMA puro presentó algún tipo de lixiviación, por lo cual se debió realizar una diferencia en los valores obtenidos para cada una de las muestras, con la finalidad de obtener sólo la lectura de absorbancia de la liberación de iones cobre.

¹⁹ Ver Anexos

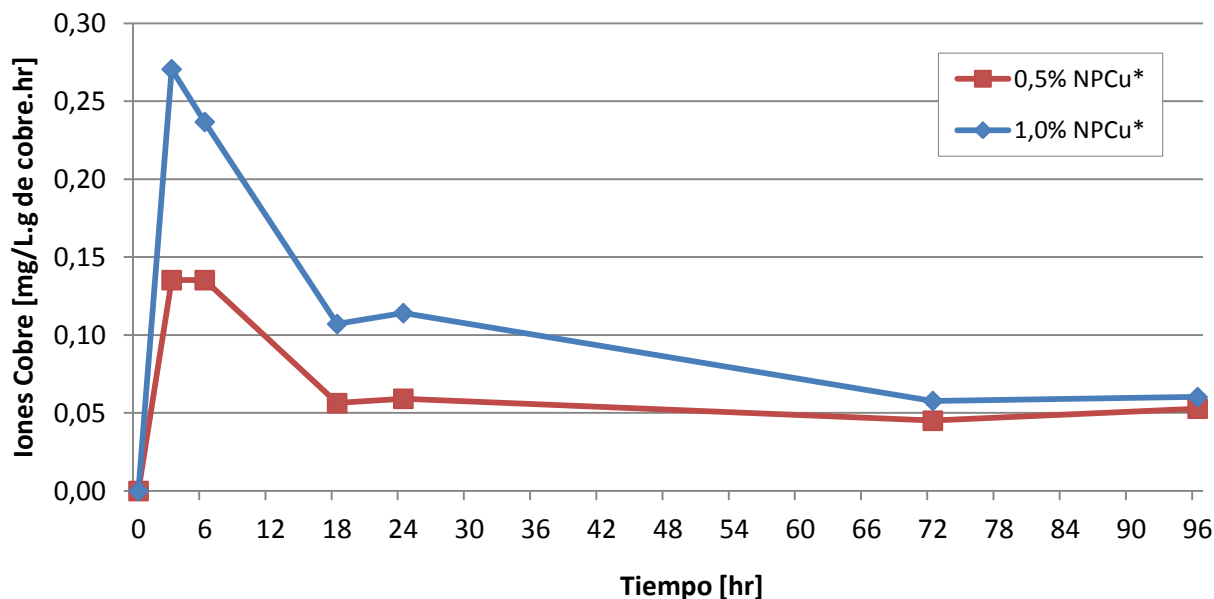


Gráfico V.16: Tasa de liberación corregida²⁰ de iones cobre [mg/L.g de NPCu.hr] desde TEGMA/BisGMA con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr]; (*): Compósito de TEGMA/BisGMA.

El gráfico anterior muestra un peak de liberación relativa de iones cobre a las 3 horas para cualquier muestra. Para un mayor detalle de los resultados expuestos en el Gráfico V.16, se puede ver en la Tabla VIII.31, que se adjunta en Anexos.

V.4. POLIPROPILENO

De manera adicional, en este trabajo se estudió el comportamiento de nanocompuestos de polipropileno, dado su carácter hidrofóbico y su baja toxicidad. Al igual que para los demás biomateriales estudiados, se realizaron ensayos de citotoxicidad, esta vez sólo sobre osteoblastos (SAOS-2).

V.4.1. Estudio de Viabilidad Celular con células SAOS-2

Para realizar el estudio de viabilidad celular del polipropileno, se prepararon discos de este polímero, en combinación con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre (10% y 20%).

De forma similar al estudio de los demás nanocompuestos, las muestras de polipropileno fueron depositadas en placas de 96 pocillos y se subcultivaron células SAOS-2 sobre ellas, para finalmente realizar el estudio de citotoxicidad por medio del método MTT, según lo explicado en la sección IV.4.

²⁰ Idem al caso anterior.

Los resultados obtenidos se muestran en el Gráfico V.17:

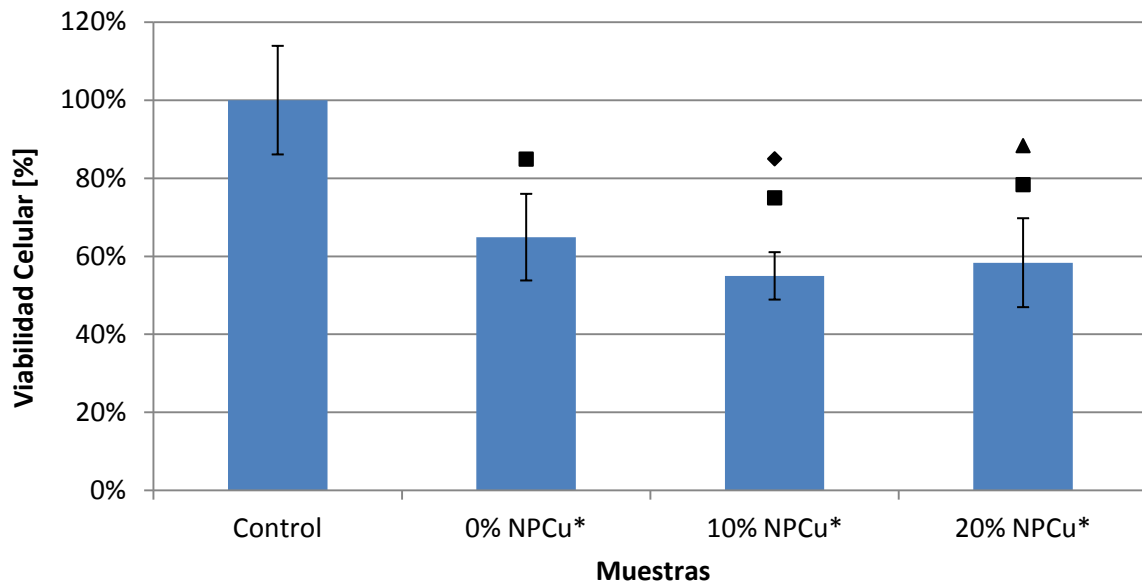


Gráfico V.17: Viabilidad celular por MTT con discos de polipropileno a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh; (*) Compósito de polipropileno. Datos: Promedio y Desviación Estándar, n=6; (■): valor $p < 0.01$ comparado con el control, utilizando Test de Tukey; (♦): valor $p < 0.01$ comparado con el polipropileno blanco, utilizando Test de Tukey; (▲): valor $p < 0.05$ comparado con el polipropileno blanco, utilizando Test de Tukey.

Tras observar el Gráfico V.17, se aprecia una viabilidad similar entre las muestras con nanopartículas de cobre, con diferencias estadísticamente no significativas (valores $p > 0,05$)²¹. Sin embargo, al comparar dichas muestras con el polipropileno blanco, se presentan diferencias significativas (valores $p < 0,05$).

De igual forma, para todas las muestras se puede establecer una viabilidad celular inferior a la muestra control, con significancia estadística (valores $p < 0,01$), en niveles que oscilan entre 55% y 60%.

El respaldo y detalle de los resultados expuestos en el Gráfico V.17 y conclusiones estadísticas adicionales, se adjuntan en Tabla VIII.32 y Tabla VIII.34, en Anexos.

A pesar de los resultados antes expuestos, y al igual que para los demás nanocompuestos poliméricos, se realizó un estudio de las mismas muestras, en ausencia de células, con el fin de verificar si existía influencia de los componentes de los discos de polipropileno en la lectura de absorbancias, al momento de practicar el ensayo de viabilidad celular.

²¹ Ver Anexos.

Los resultados de este análisis se presentan en el Gráfico V.18, para muestras con y sin células.

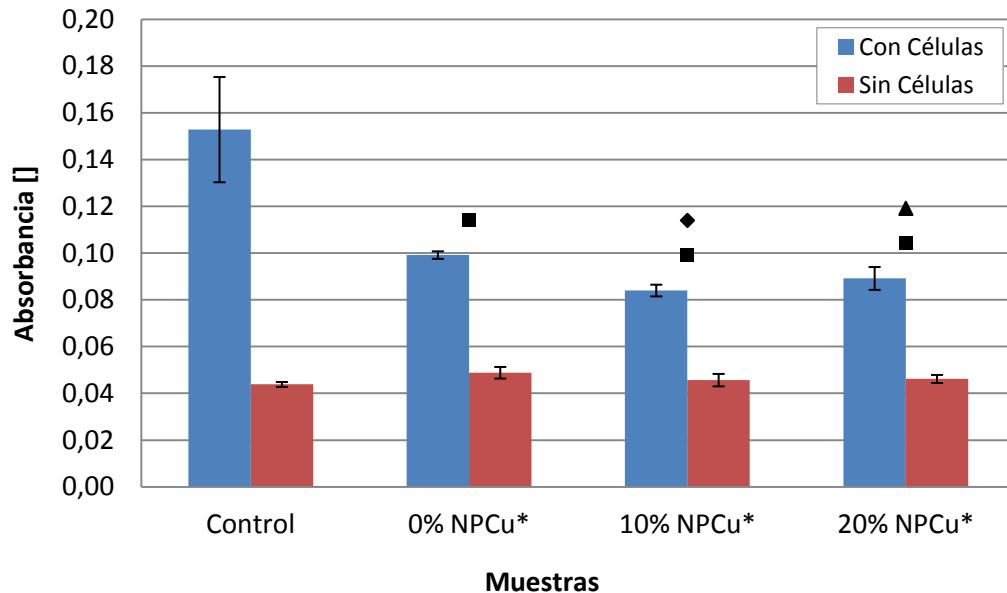


Gráfico V.18: Comparación de absorbancias con discos de polipropileno a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2; (*) Compósito de polipropileno. Datos: Promedio y Desviación Estándar, n=6; (■): valor $p < 0.01$ comparado con el control para muestras con y sin células, utilizando Test de Tukey; (♦): valor $p < 0.01$ comparado con el polipropileno blanco para muestras con células, utilizando Test de Tukey; (▲): valor $p < 0.05$ comparado con el polipropileno blanco para muestras con células, utilizando Test de Tukey.

Del gráfico anterior, se infiere que no existe una alteración en la lectura de absorbancia, con la utilización del polipropileno por sí sólo. En este sentido, se aprecia que para muestras sin células, la diferencia de absorbancia entre la muestra de polipropileno y de control es estadísticamente no significativa (valores $p > 0,05$)²², con lo cual este biomaterial no estaría generando alteraciones en la lectura de absorbancia.

La información presentada en el Gráfico V.18 y conclusiones estadísticas adicionales, se pueden encontrar en Tabla VIII.33, Tabla VIII.34 y Tabla VIII.35, que se adjuntan en Anexos.

Lo anterior demuestra que no existen factores que alteran la medición de viabilidad celular para el polipropileno. En efecto, dado que la absorbancia de muestras de polipropileno (independiente del contenido de cobre) no difieren de la muestra de control, se infiere que este material no condiciona la lectura de absorbancia en forma estadísticamente significativa. Luego, descartando el polipropileno como factor de

²² Ver Anexos.

alteración, sólo la concentración de cobre toma relevancia en la absorbancia. Debido a esto, un análisis de diferencias entre muestras sin y con células resulta innecesario.

Al analizar la incidencia del cobre dentro de la absorbancia, se concluye que este metal no afecta de manera relevante la viabilidad celular. Si bien al incorporar cobre los niveles de absorbancia se reducen respecto de la muestra de polipropileno puro, las diferencias entre nanocompositos con y sin cobre, son menores a un 15 %, lo que no podría ser considerado como un efecto significativo.

V.4.2. Estudio de Liberación de Iones Cobre

Para complementar los estudios de viabilidad celular, se realizaron estudios basados en la liberación de iones cobre, en donde al igual que en el estudio con los otros nanocompositos, se realizaron muestras de polipropileno con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre (10% y 20% de NPCu). Los resultados de lixiviación de iones cobre se muestran en el Gráfico V.19.

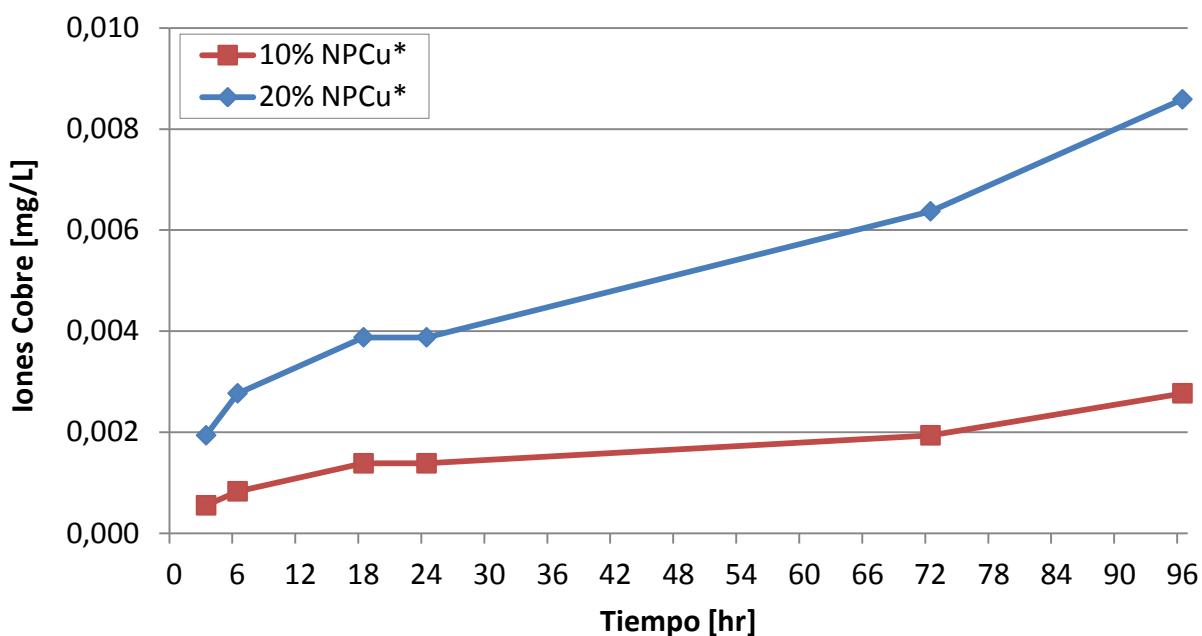


Gráfico V.19: Lixiviación corregida²³ de iones cobre [mg/L] desde polipropileno con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr]; (*) Compósito de polipropileno.

A partir del gráfico anterior, se puede apreciar que la lixiviación de iones cobre está directamente relacionada con la concentración de nanopartículas de cobre que

²³ Al igual que en los ensayos de viabilidad celular, la muestra de polipropileno puro presentó algún tipo de lixiviación, por lo cual se debió realizar una diferencia en los valores obtenidos para cada una de las muestras, con la finalidad de obtener sólo la lectura de absorbancia de la liberación de iones cobre.

presenta el nanocompósito en estudio. A pesar de esto, la viabilidad celular observada y analizada anteriormente, no puede ser comparada con estos resultados, ya que la citotoxicidad no presenta diferencias relevantes en las muestras con 10% y 20% de NPCu. Para un mayor detalle de los resultados, ver Tabla VIII.36 que se presenta adjunta en Anexos.

No se debe dejar de mencionar, que al realizar el estudio de la liberación de iones cobre también se puede estudiar la tasa de liberación de estos en las diferentes muestras realizadas. Dicho estudio se presenta en el Gráfico V.20.

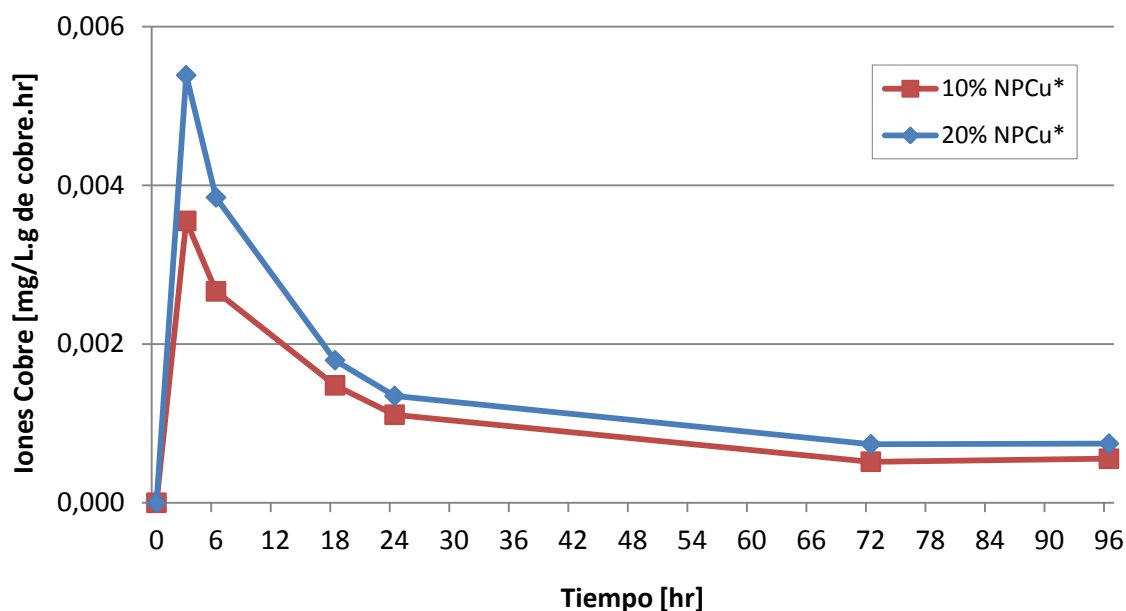


Gráfico V.20: Tasa de liberación corregida²⁴ de iones cobre [mg/L.g de NPCu.hr] desde polipropileno con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr]; (*) Compósito de polipropileno.

Tras el gráfico presentado, se observa un peak a las 3 horas para cualquier muestra. Para un mayor detalle de los resultados expuestos se puede ver Tabla VIII.37, adjunta en Anexos.

V.5. NANOPARTÍCULAS DE COBRE

Para realizar un estudio más acabado de la lixiviación de los nanocompósitos estudiados anteriormente, se realizaron estudios basados en la liberación de iones cobre directamente desde las nanopartículas de cobre sumergidas en agua desionizada.

²⁴ Idem al caso anterior.

V.5.1. Estudio de Liberación de Iones Cobre

Se estudió la liberación de iones cobre a partir de diferentes masas de nanopartículas de cobre, como se mencionara en la sección IV.5.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

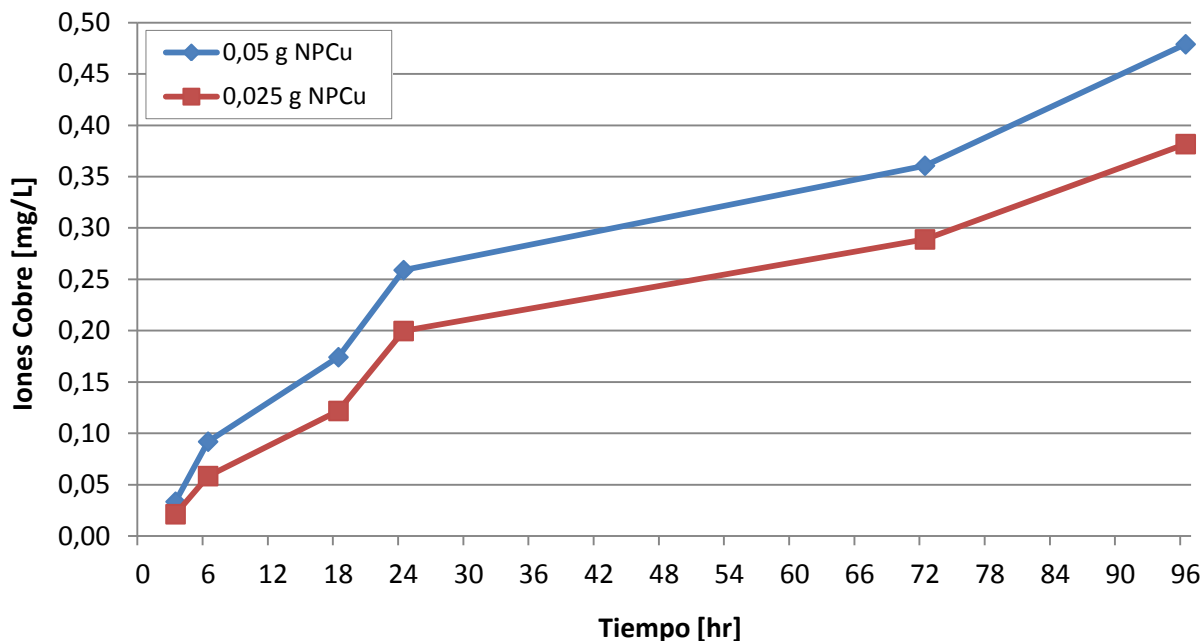


Gráfico V.21: Lixiviación de iones cobre [mg/L] desde nanopartículas de cobre directamente sumergidas en agua desionizada durante 96 [hr].

A partir del Gráfico V.21, se puede apreciar que la lixiviación de iones cobre está directamente relacionada con la cantidad de masa de nanopartículas de cobre que se utilizó para el estudio, es decir, con 0,05 [g] de NPCu la liberación de iones de cobre es mayor que con 0,025 [g] de NPCu. Para un mayor detalle de los resultados, ver Tabla VIII.38 que se presenta adjunta en Anexos.

No se debe dejar de mencionar, que al realizar el estudio de la liberación de iones cobre, también se puede estudiar la tasa de liberación de estos en las diferentes muestras analizadas. Dicho estudio se presenta en el Gráfico V.22, a continuación.

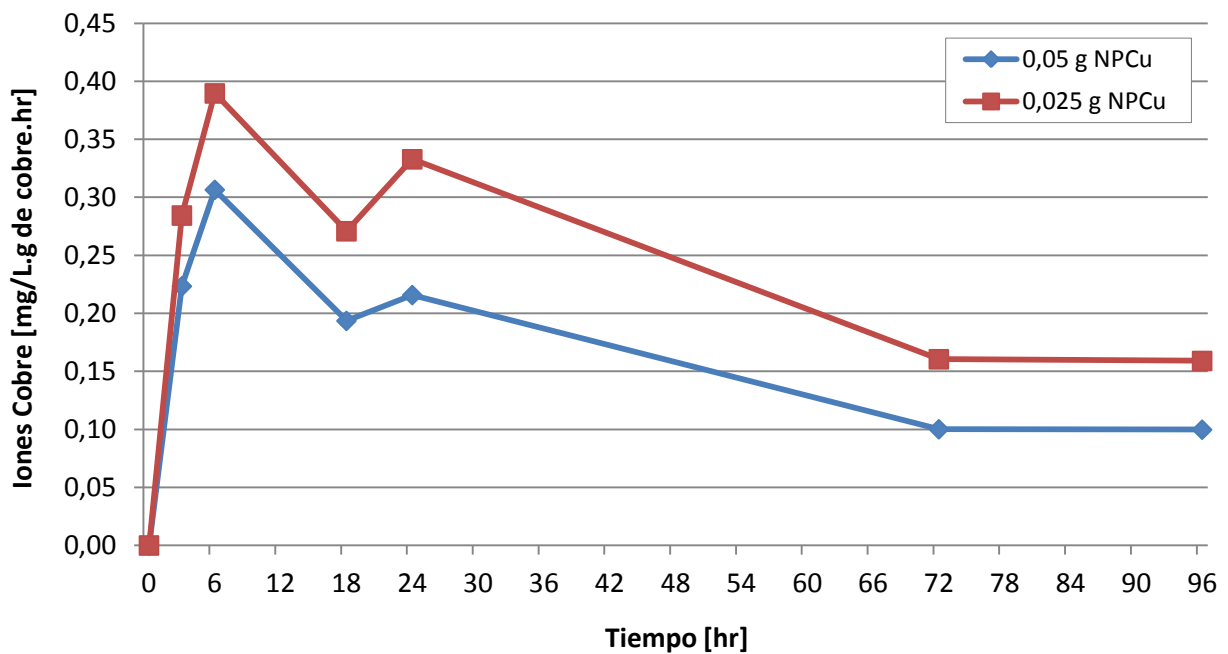


Gráfico V.22: Tasa de liberación de iones cobre [mg/L.g de NPCu.hr] desde nanopartículas de cobre directamente sumergidas en agua desionizada durante 96 [hr].

Tras el gráfico presentado, se observa un peak de liberación normalizada de iones cobre a las 6 horas para cualquier muestra.

El detalle de los resultados expuestos en el Gráfico V.22, se puede ver en la Tabla VIII.39, que se adjunta en Anexos.

V.5.2. Comparación de Liberación Normalizada de Iones Cobre

En base a los estudios de liberación de iones cobre realizados tanto para las nanopartículas de cobre puro como para cada nanocompuesto analizado, se decidió realizar una comparación de la liberación normalizada de iones cobre. Dicho estudio se presenta en el Gráfico V.23, a continuación.

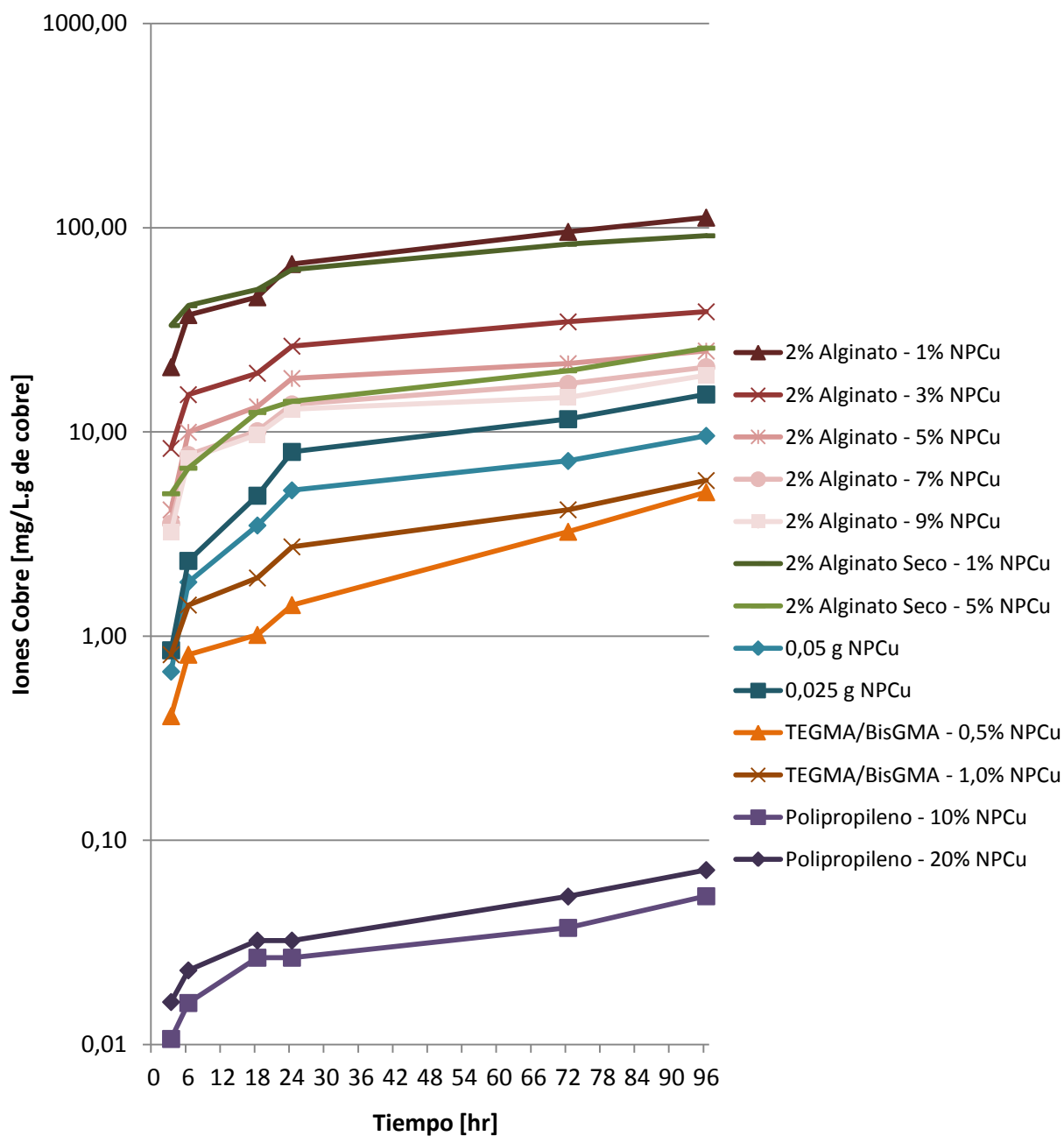


Gráfico V.23: Comparación de lixiviación normalizada de iones cobre durante 96 horas, para todos los nanocompuestos estudiados.

A partir del gráfico anterior, se observa que los compósitos de alginato²⁵, por gramo de nanopartículas de cobre contenida en ellos, tienen una capacidad de liberación relativa de iones cobre mayor a cualquier otro nanocompuesto o nanopartículas de cobre puro.

²⁵ Hidrogel de alginato o alginato seco.

Por ejemplo, el compósito de alginato²⁶ con 1% de NPCu, libera una cantidad de iones cobre 23 veces²⁷ mayor que el compósito de TEGMA/BisGMA con la misma concentración de dicho metal. Por otro lado, los 0,05 g de nanopartículas de cobre puro liberan una cantidad de iones cobre 167 veces²⁸ mayor que el polipropileno con 10%²⁹ NPCu.

De forma adicional, se puede observar que el compósito de polipropileno con 10% de nanopartículas de cobre tiene una liberación relativa 500 y 400 veces³⁰ menor que el compósito de alginato³¹ con 5% y 9% de nanopartículas de dicho metal, respectivamente. A partir de lo anterior, se aprecia que cuando la concentración de nanopartículas de cobre en la matriz de alginato disminuye a la mitad respecto al nanocompósito de polipropileno, la liberación de iones es mayor que cuando la concentración del cobre es similar en los compósitos.

El detalle de los resultados presentados en el Gráfico V.23 se puede observar en la Tabla VIII.40, Tabla VIII.41, Tabla VIII.42, Tabla VIII.43 y Tabla VIII.44, que se adjuntan en Anexos.

En base a lo anteriormente señalado, se pueden explicar dos fenómenos que pueden estar ocurriendo: (i) la aglomeración de las nanopartículas de cobre en los compósitos; (ii) y carácter hidrofílico e hidrofóbico de la matriz de alginato y polipropileno, respectivamente.

Para realizar de mejor manera una descripción respecto a la aglomeración de las nanopartículas de cobre, se realizó un análisis más acabado respecto al comportamiento de estas directamente sumergidas en agua. De esta forma, se observa que mientras mayor sea la masa de las nanopartículas de cobre puro, sumergidas en agua, menor es la liberación relativa de iones de cobre, es decir, el comportamiento observado gráficamente es inversamente proporcional a la masa de cobre respecto a la liberación de iones cobre. Lo mismo se puede apreciar para los nanocompósitos de alginato³² y polipropileno, ya que cuando presentan mayor cantidad de cobre en la matriz, menor es la liberación relativa de iones de dicho metal (ver Gráfico V.24 y Gráfico V.25).

²⁶ Hidrogel de alginato o alginato seco.

²⁷ Comparación realizada a las 24 hrs.

²⁸ Comparación realizada a las 24 hrs.

²⁹ Equivalente a 0,052 gr de nanopartículas de cobre.

³⁰ Comparación realizada a las 24 hrs.

³¹ Hidrogel de alginato o alginato seco.

³² Hidrogel de alginato o alginato seco.

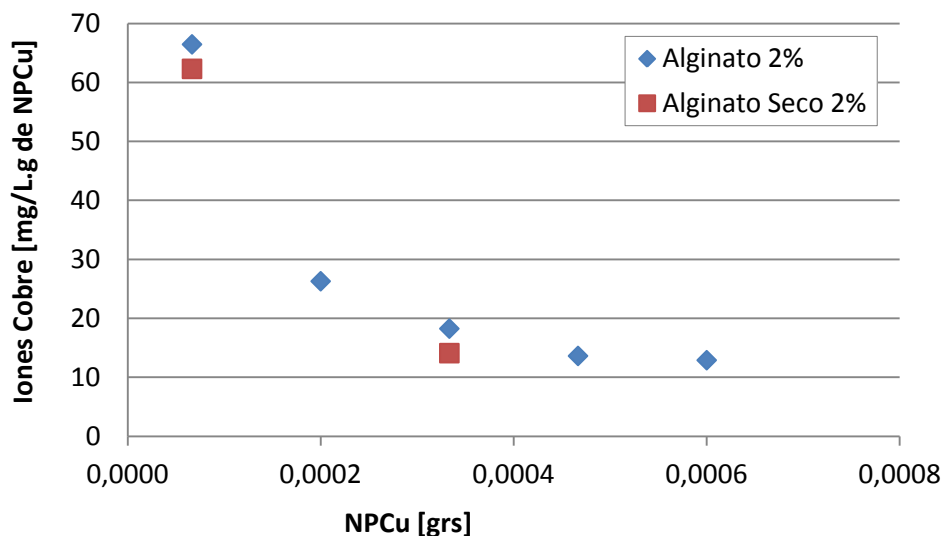


Gráfico V.24: Efecto de nanopartículas de cobre en matriz de alginato húmedo/seco sobre liberación normalizada de iones cobre a las 24 horas.

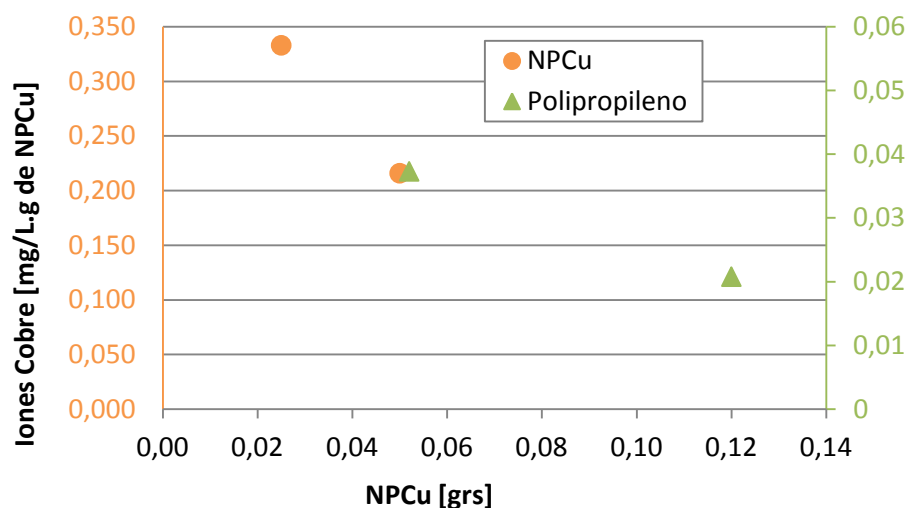


Gráfico V.25: Efecto de nanopartículas de cobre en matriz de polipropileno y nanopartículas de cobre sumergidas en agua desionizada sobre liberación normalizada de iones cobre a las 24 horas.

A partir de los gráficos anteriores, se aprecia la relación inversa entre nanopartículas de cobre y liberación de iones cobre a las 24 horas, lo cual sucede en cualquier tiempo estudiado.

En línea con lo anterior, se debe hacer referencia a lo mencionado en la sección III.2. En dicha sección, se concluyó que mientras más pequeño es el tamaño de la partícula, mayor es el área específica superficial (m^2/g), así la interacción entre las partículas de cobre y el agua desionizada es mucho más fácil y rápida [15]. Al comparar con lo obtenido experimentalmente, se observa que mientras mayor es la cantidad de

cobre en la matriz, o bien agua desionizada directamente, la dispersión de nanopartículas no es la óptima produciéndose aglomeración, provocando de esta manera la disminución del área superficial y una interacción mucho menor de las nanopartículas de cobre con el agua.

Para mayor detalle de los gráficos expuestos anteriormente, se puede observar la Tabla VIII.45, Tabla VIII.46, Tabla VIII.48 y Tabla VIII.49, las cuales se encuentran adjuntas en Anexos.

Respecto a la característica que los compósitos, sean hidrofóbicos o hidrofílicos, se debe tener presente que la matriz de alginato³³ es de carácter hidrofílico y está asociada al fenómeno de hinchamiento, que tiene relación con el comportamiento de hidrogeles.

Como se mencionara en la sección III.3.2.1, los hidrogeles deberían presentar una relación directa entre el hinchamiento y la liberación de soluto presente en este, es decir, a medida que transcurre el tiempo, el grado de hinchamiento se incrementaría, mientras que el contenido de soluto disminuiría [48]. A partir de esto, y para entender de mejor manera los fenómenos de liberación de iones cobre desde hidrogeles, se optó por realizar medidas en la variación de diámetros y de peso de las esferas de alginato húmedo y seco, respectivamente. Dichas medidas fueron obtenidas durante 96 horas para las mismas muestras en las que se realizaron los estudios de liberación de iones cobre. Los resultados se muestran en el Gráfico V.26 y Gráfico V.27.

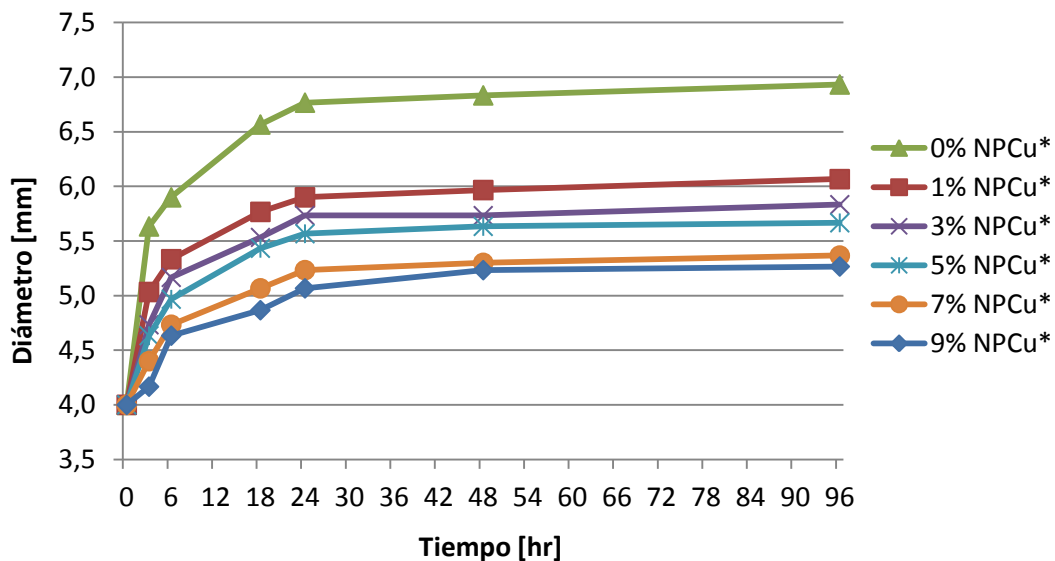


Gráfico V.26: Variación de diámetros de esferas de hidrogel de alginato con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sumergidas en agua desionizada durante 96 horas; (*): Compósito de alginato al 2%.

³³ Hidrogel de alginato o alginato seco.

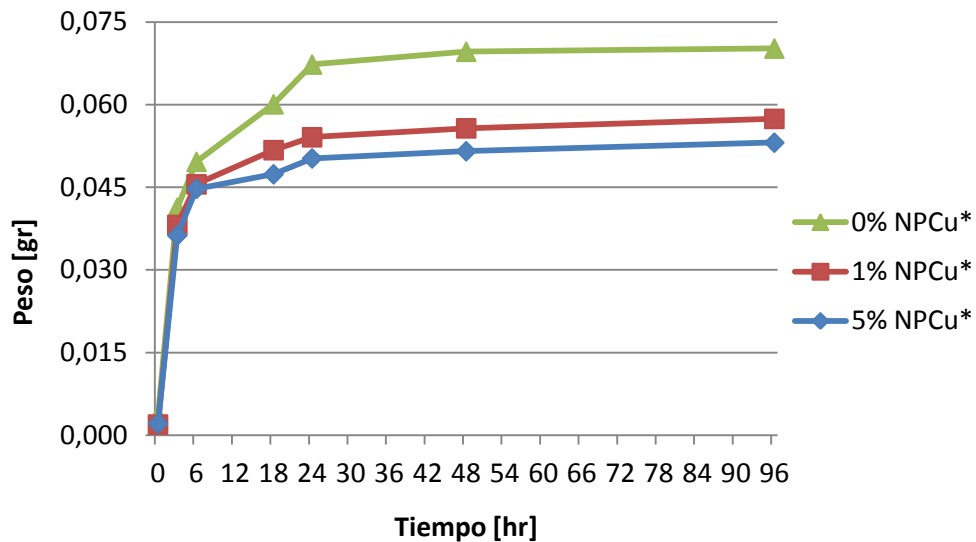


Gráfico V.27: Variación de peso de esferas de alginato seco con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sumergidas en medio de cultivo sin suero durante 96 horas; (*): Compósito de alginato seco al 2%.

A partir de los gráficos anteriores, se logra corroborar el comportamiento de la liberación relativa de la matriz, en donde efectivamente el hinchamiento es proporcional a la cantidad de nanopartículas de cobre. Es decir, cuando existe menor concentración de cobre se presenta un hinchamiento mayor en comparación a las muestras con alta concentración de este metal, observándose de esta manera una relación inversa entre la concentración de dichas nanopartículas e hinchamiento de las muestras.

En base a lo recién mencionado, se puede destacar que tanto el hinchamiento del hidrogel como la liberación de iones desde este nanocompósito, se puede deber al entrecruzamiento del alginato que tendería a incrementarse a medida que la concentración de cobre sea mayor.

Lo anterior, puede ser explicado a partir de lo mencionado en la sección III.3.2.1, donde se hizo referencia a que el ion cobre presentaba mayor afinidad al momento de generarse el entrecruzamiento de alginato respecto al ion bario, con lo cual se pueden producir porosidades en las matrices de alginato, dependiendo de la cantidad de cobre que presenten, lo que traería consigo un mayor hinchamiento al existir una mayor porosidad.

Si bien, a partir de bibliografía, se supone una alteración en la porosidad de las matrices de alginato estudiadas debido a que su grado de entrecruzamiento se puede ver alterado por el cobre, no se realizaron ensayos para la medición de este tipo de característica, por lo cual se deja planteado para futuras investigaciones realizar microscopia electrónica de barrido (SEM) a los compósitos de alginato generados.

Para mayor detalle de los gráficos expuestos anteriormente, se puede observar la Tabla VIII.50 y Tabla VIII.51, las cuales se encuentran adjuntas en Anexos.

Respecto a la matriz polimérica del TEGMA/BisGMA, se puede deducir que a medida que disminuye la concentración de nanopartícula de cobre, la liberación de iones cobre es menor. Ahora bien, y a diferencia del nanocompósito de alginato³⁴, el comportamiento observado gráficamente es directamente proporcional al momento de realizar la comparación de la concentración de cobre respecto a la liberación de iones cobre.

Adicionalmente, se debe tener presente que todos los estudios de liberación de iones cobre fueron realizados a temperatura ambiente (20°C – 25°C) y en agua desionizada (pH 5,75). Sin embargo, los estudios de viabilidad celular fueron realizados en una incubadora a 37°C y con medio de cultivo a pH 7,4.

A partir de lo anterior, la liberación de iones cobre puede verse alterada, por lo cual se propone realizar los estudios de lixiviación bajo la misma condición en que se realiza la incubación para los estudios de citotoxicidad. Un ejemplo claro es el comportamiento del alginato sin secar, debido a que se observó una variación de la matriz (hinchamiento) al momento de realizar los estudios de viabilidad celular, no así cuando se estudio la lixiviación.

³⁴ Hidrogel de alginato o alginato seco.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

En este trabajo de título se llevó a cabo satisfactoriamente la elaboración de compósitos poliméricos de alginato y del copolímero TEGMA/BisGMA, en combinación con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre. Para esto se utilizaron diversos métodos de polimerización, tales como solución (incluyendo entrecruzamiento) y fotopolimerización. De igual manera, se estudió la citotoxicidad de cada nanocompósito, sobre dos líneas celulares disponibles, así como también la liberación de iones cobre.

En base a los resultados de liberación de iones, es posible concluir que existe una alta importancia del tipo de matriz en que las nanopartículas de cobre son incorporadas. En efecto, la capacidad de liberación del alginato logró ser considerablemente mayor a la presentada por el polipropileno, TEGMA/BisGMA o bien nanopartículas de cobre puro. Del análisis, se concluyó que la menor lixiviación se debería a que la mayor concentración de nanopartículas de cobre habría generado aglomeración de las mismas, ya sea en las matrices o directamente en agua, lo que se tradujo en una menor interacción con el disolvente, generando menor liberación de iones cobre.

En el caso del nanocompósito de alginato, se pudo establecer la existencia de una baja viabilidad celular inclusive para el alginato puro, probablemente debido a su carácter hidrofílico. Esto se atribuyó principalmente a una escasa adherencia a la matriz, debido a la exigua carga superficial que presenta el hidrogel. Estos hallazgos son consistentes con diversa evidencia empírica para materiales hidrofílicos.

Adicionalmente, se observó una reducción en la viabilidad de las líneas celulares, mientras mayor era la concentración de cobre en la matriz. Esta toxicidad se debería a la lixiviación de iones cobre. Es importante señalar que el efecto de hinchamiento de la matriz tiene directa relación con la liberación de soluto que ésta contenga, lo que podría explicar los niveles de liberación observados para iones cobre.

Por otro lado, se realizó el estudio de citotoxicidad del copolímero TEGMA/BisGMA. Al igual que el alginato, este nanocompósito presentó baja viabilidad celular por la toxicidad generada por monómeros residuales, sin polimerizar al momento del fotocurado. Por su parte, la liberación de iones cobre para este compósito, no es el principal factor de toxicidad, debido a que para muestras de TEGMA/BisGMA puro se presentó una baja viabilidad celular, permitiendo descartar una influencia relevante del cobre. En este sentido, se concluyó que el TEGMA/BisGMA puro o en combinación con cobre es tóxico al menos a nivel de laboratorio (*in vitro*).

De manera adicional, se realizaron pruebas de citotoxicidad al polipropileno, incorporando ciertas concentraciones de nanopartículas de cobre para la línea celular

SAOS-2. A partir de dichos resultados, se concluye que el nivel de toxicidad de este nanocompósito es menor que el mostrado por el alginato y el copolímero TEGMA/BisGMA. Esto se explicaría porque este compuesto no mostró una liberación excesiva de iones cobre u otro elemento que pudiera estar causar citotoxicidad.

En base a los hallazgos establecidos anteriormente, se propone estudiar y extender el análisis para la utilización del alginato – en combinación con cobre – enfocado a la liberación de soluto, apósito o parche, pues pese a la toxicidad mostrada a nivel de laboratorio, pruebas *in vivo* podrían arrojar resultados distintos. Por otro lado, y no vinculado a su toxicidad, se considera – a priori – que sus características físicas no serían apropiadas para su utilización como implante o prótesis, sin embargo se propone estudiar posibles mejoras a sus propiedades para lograr una mayor adherencia.

En relación al comportamiento de TEGMA/BisGMA se haría no recomendable su uso en contacto con tejido biológico. Sin embargo, es conocido que este polímero reduce su toxicidad en condiciones *in vivo*, lo que podría abordarse en futuros estudios, a través de pruebas de ese tipo en combinación con cobre.

Respecto al polipropileno, se recomienda realizar pruebas de tipo *in vivo* para corroborar aproximaciones a tejidos biológicos de manera más certera y así aplicarlo en insumos médicos como prótesis o implantes, en combinación con materiales que le aporten mayores potencialidades.

CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA

- [1] C. Von Eiff, B. Jansen, W. Kohlen y K. Becker, «Infections Associated with Medical Devices: Pathogenesis, Management and Prophylaxis,» *Drugs*, vol. 65 (2), pp. 179-214, 2005.
- [2] B. V. S., M. S. W., E. V. S. y M. C. B., *Biomateriales para la rehabilitación del cuerpo humano*, 2005.
- [3] G. Duffo, *Materiales y materias primas. Biomateriales. Capítulo 8*, 2011.
- [4] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen y J. E. Lemons, «Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor,» *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, vol. 3, pp. xxv-xxxix, 2012.
- [5] C. R. Arciola, D. Campoccia, P. Speziale, L. Montanaro y J. W. Costerton, «Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials.,» *Biomaterials*, vol. 33, nº 26, pp. 5967-5982, Sep 2012.
- [6] P. Nercelles M, P. F. y A. del Magíster en Infecciones Intrahospitalarias, «Cost of hospital infections in medium- and high-complexity Chilean hospitals,» *Rev Panam Infectol*, vol. 10 (4 Supl 1), pp. 91-95, 2008.
- [7] R. Palma Hillerns y C. Tardito Schiele, «Cobre Antimicrobiano: científicamente comprobado,» *Antimicrobial Copper*, pp. 1-45, 2010.
- [8] D. J. Nicholson, «Current Trends in Biomaterials,» *Materials Today*, pp. 6-8.
- [9] B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, ToruMaekawa y D. S. Kumar, «Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review,» *International Journal of Polymer Science*, pp. 1-19, 2011.
- [10] P. A. Gunatillake y R. Adhikari, «Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering.,» *Eur Cell Mater*, vol. 5, pp. 1--16; discussion 16, May 2003.
- [11] B. D. Ulery, L. S. Nair y C. T. Laurencin, «Biomedical Applications of Biodegradable Polymers.,» *J Polym Sci B Polym Phys*, vol. 49, nº 12, pp. 832-864, Jun 2011.
- [12] A. Munoz-Bonilla y M. Fernández-García, «Polymeric materials with antimicrobial activity,» *Progress in Polymer Science*, vol. 37, p. 281– 339, 2012.

- [13] J. P. Jose, S. K. Malhotra, S. Thomas, K. Joseph, K. Goda y M. S. Sreekala, «Advances in Polymer Composites: Macro and Microcomposites,» *Polymer Composites*, vol. 1, pp. 1-16, 2012.
- [14] G. F. Gronemeyer, *Propiedades Antimicrobianas del Cobre*, pp. 31-56.
- [15] X. Xia, C. Xie, S. Cai, Z. Yang y X. Yang, «Corrosion characteristics of copper microparticles and copper nanoparticles in distilled water,» *Corrosion Science*, vol. 48, p. 3924–3932, 2006.
- [16] M. R. M. Antonio Millán Jiménez, *Enfermedad de Wilson. Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNPAEP*.
- [17] C. J. Serrano, *Aspectos Nutricionales y Toxicológicos de algunos elementos minerales: Cobre, Hierro, Manganeso y Zinc*.
- [18] M. C. Linder y M. Hazegh-Azam, «Copper biochemistry and molecular biology.,» *Am J Clin Nutr*, vol. 63, nº 5, pp. 797S-811S, May 1996.
- [19] T. Morán, *Cobre: Un mineral esencial para gozar de buena salud*.
- [20] INTA, *La Importancia del Cobre en la Salud*, 2011.
- [21] G. Borkow y J. Gabbay, «Copper as a biocidal tool.,» *Curr Med Chem*, vol. 12, nº 18, pp. 2163-2175, 2005.
- [22] J. O. Noyce, H. Michels y C. W. Keevil, «Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic meticillin-resistant Staphylococcus aureus in the healthcare environment.,» *J Hosp Infect*, vol. 63, nº 3, pp. 289-297, Jul 2006.
- [23] C. C. E. de Información del Cobre, *Las nuevas aplicaciones del Cobre*, 2008.
- [24] R. Seth, S. Yang, S. Choi, M. Sabeen y E. Roberts, «In vitro assessment of copper-induced toxicity in the human hepatoma line, Hep G2,» *Toxicology in Vitro*, vol. 18, p. 501–509, 2004.
- [25] Y. Li, J. Ho y C. P. Ooi, «Antibacterial efficacy and cytotoxicity studies of copper (II) and titanium (IV) substituted hydroxyapatite nanoparticles,» *Materials Science and Engineering C*, vol. 30, p. 1137–1144, 2010.

- [26] M. Valodkar, P. S. Rathore, R. N. Jadeja, M. a. D. R. V. Thounaojam y S. Thakore, «Cytotoxicity evaluation and antimicrobial studies of starch capped water soluble copper nanoparticles,» *Journal of Hazardous Materials*, vol. 201– 202, p. 244– 249, 2010.
- [27] V. Mouriño, J. P. Cattalini y A. R. Boccaccini, «Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: an overview of their biological applications and strategies for new developments.,» *J R Soc Interface*, vol. 9, nº 68, pp. 401-419, Mar 2012.
- [28] L. Finney, S. Vogt, T. Fukai y D. Glesne, «Copper and angiogenesis: unravelling a relationship key to cancer progression.,» *Clin Exp Pharmacol Physiol*, vol. 36, nº 1, pp. 88-94, Jan 2009.
- [29] C. Gérard, L.-J. Bordeleau, J. Barralet y C. J. Doillon, «The stimulation of angiogenesis and collagen deposition by copper.,» *Biomaterials*, vol. 31, nº 5, pp. 824-831, Feb 2010.
- [30] J. Barralet, U. Gbureck, P. Habibovic, E. Vorndran, C. Gerard y C. J. Doillon, «Angiogenesis in calcium phosphate scaffolds by inorganic copper ion release.,» *Tissue Eng Part A*, vol. 15, nº 7, pp. 1601-1609, Jul 2009.
- [31] M. T. Razi, M. Ahmad, M. E. Rabbani y M. Asad Saeed, «A Comparative Study of Anti-Inflammatory Activity of Diflunisal and its Copper Complex,» *International Journal of Agriculture & Biology*, vol. 5, pp. 1-3, 2003.
- [32] J. P. Rodríguez, S. Ríos y M. González, «Modulation of the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells by copper.,» *J Cell Biochem*, vol. 85, nº 1, pp. 92-100, 2002.
- [33] A. Ewald, C. Käppel, E. Vorndran, C. Moseke, M. Gelinsky y U. Gbureck, «The effect of Cu(II)-loaded brushite scaffolds on growth and activity of osteoblastic cells.,» *J Biomed Mater Res A*, vol. 100, nº 9, pp. 2392-2400, Sep 2012.
- [34] C. R. Kothapalli y A. Ramamurthi, «Copper nanoparticle cues for biomimetic cellular assembly of crosslinked elastin fibers.,» *Acta Biomater*, vol. 5, nº 2, pp. 541-553, Feb 2009.
- [35] H. Palza, S. Gutiérrez, K. Delgado, O. Salazar, V. Fuenzalida, J. I. Avila, G. Figueroa y R. Quijada, «Toward Tailor-Made Biocide Materials Based on Poly(propylene)/Copper Nanoparticles.,» *Macromol Rapid Commun*, vol. 31, nº 6, pp. 563-567, Mar 2010.

- [36] W. Zhang, Y.-H. Zhang, J.-H. Ji, J. a. ., Q. Y. Zhao y P. K. Chu, «Antimicrobial properties of copper plasma-modified polyethylene,» *Polymer*, vol. 47, pp. 7441-7445, 2006.
- [37] I. R. Kamrupi y S. K. Dolui, «Synthesis of Copper–Polystyrene Nanocomposite Particles Using Water in Supercritical Carbon Dioxide Medium and Its Antimicrobial Activity,» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 120, p. 1027–1033, 2011.
- [38] F. A. Sheikh, M. A. Kanjwal, S. Saran, W.-J. Chung y H. Kim, «Polyurethane nanofibers containing copper nanoparticles as future materials,» *Applied Surface Science*, vol. 257, pp. 3020-3026, 2011.
- [39] K. Y. Lee y D. J. Mooney, «Alginate: properties and biomedical applications.,» *Prog Polym Sci*, vol. 37, nº 1, pp. 106-126, Jan 2012.
- [40] A. Miranda-Medina, L. Peralta-Peláez, A. González-Valdés, M. García-Hernández y M. Sánchez-García, «Alginic acid and alginates production from *Azotobacter vinelandii*: Plant processing design,» *Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ)*, vol. 23 (2), pp. 91-98, 2008.
- [41] G. Hernandez-Carmona, R.-T. R. y R.-M. Y.E., «Technological Advance for Alginate Production in Mexico,» *Ingeniería Investigación y Tecnología*, vol. XIII (2), pp. 155-168, 2012.
- [42] G. Gonzalez Alvarado, *Estabilidad e Intercambio de iones Calcio en Geles de Alginato*, 2009.
- [43] J. A. Rowley y D. J. Mooney, «Alginate type and RGD density control myoblast phenotype.,» *J Biomed Mater Res*, vol. 60, nº 2, pp. 217-223, May 2002.
- [44] Y. A. Mørch, I. Donati, B. L. Strand y G. Skjåk-Braek, «Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on alginate microbeads.,» *Biomacromolecules*, vol. 7, nº 5, pp. 1471-1480, May 2006.
- [45] S. K. H. Gulrez, S. Al-Assaf y G. O. Phillips, «Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications,» *Intech*, pp. 117-151, 2011.
- [46] P. D. O. S. P. D. G. S.-B. Dr. Kurt Ingar Draget, «Alginates from Algae,» 2005.
- [47] V. Vaithilingam y B. E. Tuch, «Islet transplantation and encapsulation: an update on recent developments.,» *Rev Diabet Stud*, vol. 8, nº 1, pp. 51-67, 2011.

- [48] N. Pinzón, A. Espinosa, J. Perilla, E. Hernáez y I. Katime, «Modelamiento del hinchamiento y difusión de solutos en hidrogeles,» *Revista Iberoamericana de Polímeros*, vol. 3(2), pp. 38-54, 2002.
- [49] V. L. Gonçalves, M. C. M. Laranjeira, V. T. Fávere y R. C. Pedrosa, «Effect of Crosslinking Agents on Chitosan Microspheres in Controlled Release of Diclofenac Sodium,» *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 15 (1), pp. 6-12, 2005.
- [50] K. Y. Lee y D. J. Mooney, «Hydrogels for Tissue Engineering,» *Chemical Reviews*, vol. 101, pp. 1869-1879, 2001.
- [51] «Polymers for Dental and Orthopedic Applications,» pp. 14-58.
- [52] G. Schmalz, «Resin-Based Composites,» pp. 99-137.
- [53] D. Lafuente, R. Blanco y A. Brenes, «Efecto del tipo de lámpara de Fotocurado en la Polimerización de varias resinas,» *Publicación Científica Facultad de Odontología*, vol. 7, pp. 89-95, 2005.
- [54] A. Bakopoulou, T. Papadopoulos y P. Garefis, «Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials.,» *Int J Mol Sci*, vol. 10, nº 9, pp. 3861-3899, Sep 2009.
- [55] C. Maya, M. Vallejo y N. E. Martinez, «Citotoxicidad de los adhesivos dentinarios,» *Revista CES Odontología*, Vols. %1 de %2Vol. 23 - No. 2, pp. 79-90, 2010.
- [56] R. I. Freshney, *Culture of Animal Cells - A manual of basic technique*, John Wiley & Sons, 2005.
- [57] K. Szydłowska y M. Tymianski, «Calcium, ischemia and excitotoxicity.,» *Cell Calcium*, vol. 47, nº 2, pp. 122-129, Feb 2010.
- [58] G. E. Kass y S. Orrenius, «Calcium signaling and cytotoxicity.,» *Environ Health Perspect*, vol. 107 Suppl 1, pp. 25-35, Feb 1999.
- [59] A. A. Pimentel y G. Benaim, «El Ca²⁺ y los esfingolípidos como moduladores de la apoptosis y el cáncer.,» *Investigación Clínica*, vol. 53(1), pp. 84-110, 2012.
- [60] N. A. Monteiro-Riviere, A. O. Inman y L. W. Zhang, «Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line.,» *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 234, nº 2, pp. 222-235, Jan 2009.

CAPÍTULO VIII: ANEXOS

A continuación, se detallan los resultados obtenidos para los análisis realizados a los nanocompuestos estudiados. Lo anterior no sólo incluye el resultado empírico, sino que también los cálculos necesarios para realizar la preparación de los nanocompuestos en estudio.

También, y como fuera mencionado en la sección V.1, se realizaron diferentes análisis que permitieran generar una discusión respecto a los atributos del alginato como biomaterial, los que también se presentan en esta sección.

VIII.1. ALGINATO

VIII.1.1. Preparación de Nanocompuestos de Alginato

Como fuera mencionado en la sección IV.1.1, se realizaron diferentes cálculos para la preparación de nanocompuestos de alginato, tanto asociados a la solución misma, como a la solución necesaria para realizar la gelificación. Dichos cálculos se presentan en las tablas Tabla VIII.1 y Tabla VIII.2:

Tabla VIII.1: Preparación de solución de alginato con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre.

Concentración de Nanopartículas de Cobre	Alginato / Agua Ultra Pura		
	2,0 grs / 100 ml	0,5 grs / 25 ml	0,4 grs / 20 ml
1,00%	0,020	0,005	0,004
2,00%	0,040	0,010	0,008
3,00%	0,060	0,015	0,012
4,00%	0,080	0,020	0,016
5,00%	0,100	0,025	0,020
6,00%	0,120	0,030	0,024
7,00%	0,140	0,035	0,028
8,00%	0,160	0,040	0,032
9,00%	0,180	0,045	0,036
10,00%	0,200	0,050	0,040

Tabla VIII.2: Preparación de solución entrecruzante para gelificación de solución de alginato.

	BaCl ₂ 0,02M	CaCl ₂ 0,02M
PM	208,23	110,00
Solución en 100 ml	0,42	0,22

VIII.1.2. Estudio de Viabilidad Celular con células CNh

En este ámbito, se realizaron diversas pruebas de viabilidad celular con alginato, de tal forma de analizar los factores que pudiesen afectar esta condición. Así, se estudió el ion entrecruzante utilizado, la forma geométrica de la muestra y la influencia del cobre, lo que fue complementado con un análisis estadístico de significancia de medias, a través del Test de Tukey.

VIII.1.2.1. Influencia de ion entrecruzante

A continuación, se presentan los resultados de viabilidad celular con esferas de alginato para el análisis de la influencia del ion entrecruzante sobre células de corteza cerebral de ratón fetal normal (CNh). Los resultados se encuentran en la Tabla VIII.3.

Tabla VIII.3: Viabilidad celular con esferas de alginato para células CNh según medio entrecruzante.

	BaCl₂ 0,02M	CaCl₂ 0,02M
Control	100,00%	
2% Alginato puro	60,88%	60,51%

Una vez obtenidos estos resultados, se realizó un análisis estadístico de significancia de medias con el Test de Tukey, el cual se presenta en la Tabla VIII.4:

Tabla VIII.4: Análisis estadístico Tukey para esferas de alginato para células CNh según medio entrecruzante.

Grupos	<i>Control</i>	<i>2% Alg. BaCl₂</i>	<i>2% Alg. CaCl₂</i>
<i>Control</i>		35,24704	35,58272
<i>2% Alg BaCl₂</i>	p<0.01		0,33569
<i>2% Alg CaCl₂</i>	p<0.01	n.s.	

VIII.1.2.2. Influencia de iones cobre

A continuación se presentan los resultados obtenidos para el estudio de viabilidad celular de alginato con concentraciones de cobre que variaron 1% y 10%, en intervalos de 1%, además de muestras de alginato puro.

En la Tabla VIII.5 se muestran estos resultados de viabilidad celular, comparando la influencia de las muestras, para poder analizar de mejor manera los niveles de citotoxicidad.

Tabla VIII.5: Viabilidad celular con esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh.

	Sin interferencia de alginato	Con interferencia de alginato
Control	100,00%	100,00%
2% Alginato puro	62,94%	34,42%
2% Alginato con 1% NPCu	47,04%	17,15%
2% Alginato con 2% NPCu	41,90%	8,25%
2% Alginato con 3% NPCu	36,26%	5,24%
2% Alginato con 4% NPCu	37,15%	1,70%
2% Alginato con 5% NPCu	42,59%	1,05%
2% Alginato con 6% NPCu	50,40%	1,18%
2% Alginato con 7% NPCu	57,51%	0,13%
2% Alginato con 8% NPCu	57,41%	0,39%
2% Alginato con 9% NPCu	54,84%	0,13%
2% Alginato con 10% NPCu	57,91%	0,79%

Para la realización de la tabla anterior, se debió realizar una comparación de absorbancias, con la finalidad de determinar la importancia de la interferencia del sustrato. Estas absorbancias pueden ser observadas en la Tabla VIII.6:

Tabla VIII.6: Comparación de absorbancias con esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh.

	Sin células	Con células
Control	0,041	0,169
2% Alginato puro	0,062	0,106
2% Alginato con 1% NPCu	0,058	0,079
2% Alginato con 2% NPCu	0,060	0,071
2% Alginato con 3% NPCu	0,055	0,061
2% Alginato con 4% NPCu	0,061	0,063
2% Alginato con 5% NPCu	0,071	0,072
2% Alginato con 6% NPCu	0,084	0,085
2% Alginato con 7% NPCu	0,097	0,097
2% Alginato con 8% NPCu	0,096	0,097
2% Alginato con 9% NPCu	0,092	0,093
2% Alginato con 10% NPCu	0,097	0,098

Para complementar este análisis, se llevaron a cabo test de significancia estadística de medias, a través de la metodología de Tukey, cuyos resultados se presentan en la Tabla VIII.7 y la Tabla VIII.8:

Tabla VIII.7: Análisis estadístico Tukey para esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh.

Grupos	<i>Control</i>	<i>2% Alg.</i>	<i>1% NPCu</i>	<i>2% NPCu</i>	<i>3% NPCu</i>	<i>4% NPCu</i>
<i>Control</i>		17,43620	24,92215	27,33997	29,99027	29,57180
<i>2% Alg</i>	p<0.01		7,48594	9,90376	12,55407	12,13560
<i>1% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01		2,41782	5,06812	4,64965
<i>2% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	n.s.		2,65030	2,23183
<i>3% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	p<0.05	n.s.		-0,41847
<i>4% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	n.s.	n.s.	n.s.	
<i>5% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>6% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	n.s.	n.s.	p<0.01	p<0.01
<i>7% NPCu</i>	p<0.01	n.s.	p<0.05	p<0.01	p<0.01	p<0.01
<i>8% NPCu</i>	p<0.01	n.s.	p<0.05	p<0.01	p<0.01	p<0.01
<i>9% NPCu</i>	p<0.01	n.s.	n.s.	p<0.01	p<0.01	p<0.01
<i>10% NPCu</i>	p<0.01	n.s.	p<0.05	p<0.01	p<0.01	p<0.01

Continuación Análisis estadístico Tukey para esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh.

Grupos	<i>5% NPCu</i>	<i>6% NPCu</i>	<i>7% NPCu</i>	<i>8% NPCu</i>	<i>9% NPCu</i>	<i>10% NPCu</i>
<i>Control</i>	27,01449	23,34126	19,99351	20,04001	21,24892	19,80753
<i>2% Alg.</i>	9,57829	5,90506	2,55731	2,60381	3,81272	2,37132
<i>1% NPCu</i>	2,09234	-1,58088	-4,92863	-4,88214	-3,67323	-5,11462
<i>2% NPCu</i>	-0,32548	-3,99870	-7,34645	-7,29996	-6,09105	-7,53244
<i>3% NPCu</i>	-2,97578	-6,64901	-9,99676	-9,95026	-8,74135	-10,18274
<i>4% NPCu</i>	-2,55731	-6,23054	-9,57829	-9,53179	-8,32288	-9,76427
<i>5% NPCu</i>		-3,67323	-7,02098	-6,97448	-5,76557	-7,20696
<i>6% NPCu</i>	n.s.		-3,34775	-3,30125	-2,09234	-3,53374
<i>7% NPCu</i>	p<0.01	n.s.		0,04650	1,25541	-0,18599
<i>8% NPCu</i>	p<0.01	n.s.	n.s.		1,20891	-0,23248
<i>9% NPCu</i>	p<0.01	n.s.	n.s.	n.s.		-1,44139
<i>10% NPCu</i>	p<0.01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

Tabla VIII.8: Análisis estadístico Tukey para esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sin células CNh.

Grupos	<i>Control</i>	<i>2% Alg.</i>	<i>1% NPCu</i>	<i>2% NPCu</i>	<i>3% NPCu</i>	<i>4% NPCu</i>
<i>Control</i>		-14,84924	-11,66726	-13,08148	-9,54594	-13,78858
<i>2% Alg.</i>	p<0.01		3,18198	1,76777	5,30330	1,06066
<i>1% NPCu</i>	p<0.01	n.s.		-1,41421	2,12132	-2,12132
<i>2% NPCu</i>	p<0.01	n.s.	n.s.		3,53553	-0,70711
<i>3% NPCu</i>	p<0.01	p<0.05	n.s.	n.s.		-4,24264
<i>4% NPCu</i>	p<0.01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
<i>5% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01
<i>6% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01
<i>7% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01
<i>8% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01
<i>9% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01
<i>10% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01

Continuación Análisis estadístico Tukey para esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sin células CNh.

Grupos	5% NPCu	6% NPCu	7% NPCu	8% NPCu	9% NPCu	10% NPCu
<i>Control</i>	-20,85965	-30,40559	-39,36228	-39,12658	21,24892	-39,24443
<i>2% Alg.</i>	-6,01041	-15,55635	-24,51304	-24,27733	3,81272	-24,39518
<i>1% NPCu</i>	-9,19239	-18,73833	-27,69502	-27,45931	-3,67323	-27,57716
<i>2% NPCu</i>	-7,77817	-17,32412	-26,28080	-26,04510	-6,09105	-26,16295
<i>3% NPCu</i>	-11,31371	-20,85965	-29,81634	-29,58063	-8,74135	-29,69848
<i>4% NPCu</i>	-7,07107	-16,61701	-25,57370	-25,33799	-8,32288	-25,45584
<i>5% NPCu</i>		-9,54594	-18,50263	-18,26693	-5,76557	-18,38478
<i>6% NPCu</i>	p<0.01		-8,95669	-8,72098	-2,09234	-8,83883
<i>7% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01		0,23570	1,25541	0,11785
<i>8% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	n.s.		1,20891	-0,11785
<i>9% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	n.s.	n.s.		-3,18198
<i>10% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	n.s.	n.s.	n.s.	

VIII.1.2.3. Influencia de la geometría de nanocompuesto en la adherencia celular

Como se mencionara anteriormente, también se realizó un estudio de la geometría de las muestras, con la finalidad de determinar si este elemento podría estar afectando los niveles adherencia celular. Estos resultados son presentados en la Tabla VIII.9:

Tabla VIII.9: Viabilidad celular con discos de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh.

	Sin interferencia de alginato	Con interferencia de alginato
Control	100,00%	100,00%
2% Alginato puro	32,84%	4,35%
2% Alginato con 1% NPCu	31,94%	4,16%
2% Alginato con 3% NPCu	28,97%	2,96%
2% Alginato con 5% NPCu	28,52%	1,57%
2% Alginato con 7% NPCu	35,74%	0,65%
2% Alginato con 9% NPCu	36,41%	0,37%

Como en casos anteriores, para la obtención de la tabla anterior, se debió realizar una comparación de absorbancias, para determinar la relevancia de la interferencia del sustrato. Estas absorbancias pueden ser observadas en la Tabla VIII.10:

Tabla VIII.10: Comparación de absorbancias con discos de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh.

	Sin células	Con células
Control	0,044	0,224
2% Alginato puro	0,066	0,074
2% Alginato con 1% NPCu	0,064	0,072
2% Alginato con 3% NPCu	0,060	0,065
2% Alginato con 5% NPCu	0,061	0,064
2% Alginato con 7% NPCu	0,079	0,080
2% Alginato con 9% NPCu	0,081	0,082

Una vez obtenidos estos resultados, se realizó un análisis estadístico con el Test de Tukey, cuyos resultados se presentan en la Tabla VIII.11 y Tabla VIII.12:

Tabla VIII.11: Análisis estadístico Tukey para discos de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh.

Grupos	<i>Control</i>	<i>2% Alg.</i>	<i>1% NPCu</i>	<i>3% NPCu</i>	<i>5% NPCu</i>	<i>7% NPCu</i>	<i>9% NPCu</i>
<i>Control</i>		30,74387	31,13827	32,51624	32,72075	29,41459	29,10783
<i>2% Alg.</i>	p<0.01		0,39440	1,77237	1,97688	-1,32928	-1,63604
<i>1% NPCu</i>	p<0.01	n.s.		1,37797	1,58248	-1,72368	-2,03044
<i>3% NPCu</i>	p<0.01	n.s.	n.s.		0,20450	-3,10165	-3,40841
<i>5% NPCu</i>	p<0.01	n.s.	n.s.	n.s.		-3,30616	-3,61292
<i>7% NPCu</i>	p<0.01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		-0,30676
<i>9% NPCu</i>	p<0.01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

Tabla VIII.12: Análisis estadístico Tukey para discos de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sin células CNh.

Grupos	<i>Control</i>	<i>2% Alg.</i>	<i>1% NPCu</i>	<i>3% NPCu</i>	<i>5% NPCu</i>	<i>7% NPCu</i>	<i>9% NPCu</i>
<i>Control</i>		-15,23624	-14,08198	-10,96548	-12,00431	-24,35491	-25,74002
<i>2% Alg.</i>	p<0.01		1,15426	4,27077	3,23193	-9,11866	-10,50377
<i>1% NPCu</i>	p<0.01	n.s.		3,11650	2,07767	-10,27292	-11,65804
<i>3% NPCu</i>	p<0.01	n.s.	n.s.		-1,03883	-13,38943	-14,77454
<i>5% NPCu</i>	p<0.01	n.s.	n.s.	n.s.		-12,35059	-13,73570
<i>7% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01		-1,38511
<i>9% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	n.s.	

VIII.1.3. Estudio de Viabilidad Celular con células SAOS-2

Al igual que en caso del alginato con células CNh, se presentan los resultados obtenidos para el estudio de viabilidad celular de alginato con diferentes concentraciones de cobre, pero para la línea celular SAOS-2.

Estos resultados se muestran en la Tabla VIII.13, donde se compara la influencia de las muestras, para poder analizar de mejor manera la citotoxicidad.

Tabla VIII.13: Viabilidad celular con esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2.

	Sin interferencia de alginato	Con interferencia de alginato
Control	100,00%	100,00%
2% Alginato puro	71,41%	47,37%
2% Alginato con 1% NPCu	54,03%	17,22%
2% Alginato con 3% NPCu	42,59%	0,96%
2% Alginato con 5% NPCu	35,36%	3,51%
2% Alginato con 7% NPCu	38,97%	1,75%
2% Alginato con 9% NPCu	45,39%	4,31%

La tabla anterior requirió una comparación de absorbancias, con el objetivo de determinar la importancia de la interferencia del sustrato. Estas absorbancias pueden ser observadas en la Tabla VIII.14:

Tabla VIII.14: Comparación de absorbancias con esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2.

	Sin células	Con células
Control	0,038	0,143
2% Alginato puro	0,053	0,102
2% Alginato con 1% NPCu	0,059	0,077
2% Alginato con 3% NPCu	0,060	0,061
2% Alginato con 5% NPCu	0,047	0,051
2% Alginato con 7% NPCu	0,054	0,056
2% Alginato con 9% NPCu	0,060	0,065

Complementando estos resultados, se realizó un análisis de significancia estadística de medias, mediante el Test de Tukey. Estos resultados se presentan en la Tabla VIII.15 y la Tabla VIII.16:

Tabla VIII.15: Análisis estadístico Tukey para esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2.

Grupos	<i>Control</i>	<i>2% Alg</i>	<i>1% NPCu</i>	<i>3% NPCu</i>	<i>5% NPCu</i>	<i>7% NPCu</i>	<i>9% NPCu</i>
<i>Control</i>		8,37323	13,46552	16,81481	18,93375	17,87428	15,99458
<i>2% Alg</i>	p<0.01		5,09229	8,44158	10,56052	9,50105	7,62135
<i>1% NPCu</i>	p<0.01	p<0.05		3,34929	5,46823	4,40876	2,52906
<i>3% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	n.s.		2,11894	1,05947	-0,82023
<i>5% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	p<0.01	n.s.		-1,05947	-2,93917
<i>7% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	n.s.	n.s.	n.s.		-1,87970
<i>9% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

Tabla VIII.16: Análisis estadístico Tukey para esferas de alginato a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sin células SAOS-2.

Grupos	<i>Control</i>	<i>2% Alg</i>	<i>1% NPCu</i>	<i>3% NPCu</i>	<i>5% NPCu</i>	<i>7% NPCu</i>	<i>9% NPCu</i>
<i>Control</i>		-13,10242	-19,26827	-19,88485	-7,86145	-14,33559	-20,34729
<i>2% Alg</i>	p<0.01		-6,16585	-6,78243	5,24097	-1,23317	-7,24487
<i>1% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01		-0,61658	11,40681	4,93268	-1,07902
<i>3% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	n.s.		12,02340	5,54926	-0,46244
<i>5% NPCu</i>	p<0.01	p<0.05	p<0.01	p<0.01		-6,47414	-12,48584
<i>7% NPCu</i>	p<0.01	n.s.	p<0.05	p<0.01	p<0.01		-6,01170
<i>9% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	n.s.	n.s.	p<0.01	p<0.01	

VIII.1.4. Estudio de Liberación de Iones Cobre

Para corroborar los resultados anteriores, se realizaron estudios de lixiviación a las muestras de alginato, con distintas concentraciones de cobre, cuyos hallazgos se presentan en la Tabla VIII.17:

Tabla VIII.17: Lixiviación de iones cobre [mg/L] desde esferas de alginato con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].

Tiempo [hr]	Muestra					
	2% Alg. 1% NPCu	2% Alg. 3% NPCu	2% Alg. 5% NPCu	2% Alg. 7% NPCu	2% Alg. 9% NPCu	
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
3	0,0014	0,0017	0,0014	0,0017	0,0019	0,0019
6	0,0025	0,0030	0,0033	0,0036	0,0044	0,0044
18	0,0030	0,0039	0,0044	0,0047	0,0058	0,0058
24	0,0044	0,0053	0,0061	0,0064	0,0078	0,0078
72	0,0064	0,0069	0,0072	0,0080	0,0089	0,0089
96	0,0075	0,0078	0,0083	0,0097	0,0114	0,0114

Adicionalmente, se estudió la tasa de liberación del hidrogel de alginato, en diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre. Dichos resultados se detallan en la Tabla VIII.18:

Tabla VIII.18: Tasa de liberación de iones cobre [mg/L.g de NPCu.hr] desde esferas de alginato con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].

Tiempo [hr]	Muestra				
	2% Alg. 1% NPCu	2% Alg. 3% NPCu	2% Alg. 5% NPCu	2% Alg. 7% NPCu	2% Alg. 9% NPCu
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
3	6,9252	2,7701	1,3850	1,1872	1,0773
6	6,2327	2,5392	1,6620	1,2861	1,2311
18	2,5392	1,0773	0,7387	0,5606	0,5386
24	2,7701	1,0965	0,7618	0,5689	0,5386
72	1,9910	0,7214	0,4501	0,3586	0,3078
96	1,1686	0,4040	0,2597	0,2164	0,1972

VIII.2. ALGINATO SECO

VIII.2.1. Estudio de Viabilidad Celular con células SAOS-2

Se realizaron pruebas de viabilidad celular con alginato seco para la línea celular SAOS-2, de tal forma de determinar los factores que pudiesen afectar la supervivencia, principalmente analizando si existe alguna influencia del ion cobre en términos de citotoxicidad. Los resultados se presentan en la Tabla VIII.19, a continuación:

Tabla VIII.19: Viabilidad celular con alginato seco a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2.

	Sin interferencia de alginato	Con interferencia de alginato
Control	100,00%	100,00%
2% Alginato puro	75,87%	56,99%
2% Alginato con 1% NPCu	39,33%	1,22%
2% Alginato con 5% NPCu	40,02%	1,75%

Para la obtención de los resultados anteriores, se debió llevar a cabo una comparación de absorbancias, con la finalidad de determinar la importancia de la interferencia del sustrato. Estas absorbancias pueden ser observadas en la Tabla VIII.20:

Tabla VIII.20: Comparación de absorbancias con alginato seco a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2.

	Sin células	Con células
Control	0,048	0,144
2% Alginato puro	0,055	0,109
2% Alginato con 1% NPCu	0,055	0,057
2% Alginato con 5% NPCu	0,056	0,058

Con el objetivo de dar mayor soporte a los resultados anteriores, se realizó un análisis de significancia estadística de medias utilizando el Test de Tukey. Los resultados se presentan en la Tabla VIII.21 y Tabla VIII.22.

Tabla VIII.21: Análisis estadístico Tukey para alginato seco a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2.

Grupos	<i>Control</i>	<i>2% Alg.</i>	<i>1% NPCu</i>	<i>5% NPCu</i>
<i>Control</i>		15,10183	37,97240	37,53677
<i>2% Alg.</i>	p<0.01		22,87056	22,43493
<i>1% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01		-0,43563
<i>5% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01	n.s.	

Tabla VIII.22: Análisis estadístico Tukey para alginato seco a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sin células SAOS-2.

Grupos	<i>Control</i>	<i>2% Alg</i>	<i>1% NPCu</i>	<i>5% NPCu</i>
<i>Control</i>		-4,26321	-4,71197	-5,04854
<i>2% Alg</i>	p<0.05		-0,44876	-0,78533
<i>1% NPCu</i>	p<0.05	n.s.		-0,33657
<i>5% NPCu</i>	p<0.01	n.s.	n.s.	

VIII.2.2. Estudio de Liberación de Iones Cobre

Para corroborar los resultados anteriores, se realizaron estudios de lixiviación a las muestras de alginato seco, con diferentes concentraciones de cobre. Los resultados de estos análisis se presentan en la Tabla VIII.23.

Tabla VIII.23: Lixiviación de iones cobre [mg/L] desde alginato seco con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].

Tiempo [hr]	Muestra	
	2% Alg. 1% NPCu	2% Alg. 5% NPCu
0	0,0000	0,0000
3	0,0022	0,0017
6	0,0028	0,0022
18	0,0033	0,0042
24	0,0042	0,0047
72	0,0055	0,0066
96	0,0061	0,0086

Adicionalmente, se estudió la tasa de liberación que presenta el hidrogel de alginato, con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre. Dichos resultados se detallan en la Tabla VIII.24:

Tabla VIII.24: Tasa de liberación de iones cobre [mg/L.g de NPCu.hr] desde alginato seco con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].

Tiempo [hr]	Muestra	
	2% Alg. 1% NPCu	2% Alg. 5% NPCu
0	0,0000	0,0000
3	11,0803	1,6620
6	6,9252	1,1080
18	2,7701	0,6925
24	2,5970	0,5886
72	1,1542	0,2770
96	0,9522	0,2684

VIII.3. TEGMA/BISGMA

VIII.3.1. Preparación de Nanocompósitos de TEGMA/BisGMA

Como fue mencionado en la sección IV.1.2, se prepararon nanocompósitos de TEGMA/BisGMA. Los cálculos realizados para estas preparaciones, se presentan en la Tabla VIII.25:

Tabla VIII.25: Preparación de solución TEGMA/BisGMA con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre.

Componentes	%	grs
TEGMA	49,50	0,2723
BisGMA	49,50	0,2723
Camphorquinone	0,20	0,0011
Ethyl-4-dimethylamino-benzoato	0,80	0,0044
NPCu	1,00	0,0456
NPCu	0,50	0,0228

Adicionalmente, como fue mencionado en la sección V.3, se realizaron diferentes análisis que permitieran una profunda discusión respecto a la utilización de TEGMA/BisGMA como biomaterial, en combinación con cobre. Dichos resultados se presentan a continuación.

VIII.3.2. Estudio de Viabilidad Celular con células CNh

Se realizaron pruebas de viabilidad celular con el copolímero TEGMA/BisGMA, de tal forma de determinar los factores que pudiesen afectar la supervivencia, principalmente definiendo la potencial influencia de la porción de monómero que pudiese quedar sin polimerizar.

En la Tabla VIII.26 se presentan los resultados de viabilidad celular para discos de TEGMA/BisGMA, sobre las células de corteza cerebral de ratón fetal normal (CNh).

Tabla VIII.26: Viabilidad celular con discos de TEGMA/BisGMA a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh.

	Sin interferencia de TEGMA/BisGMA	Con interferencia de TEGMA/BisGMA
Control	100,00%	100,00%
TEGMA/BisGMA puro	32,26%	2,09%
TEGMA/BisGMA con 0,5% NPCu	31,85%	1,25%
TEGMA/BisGMA con 1% NPCu	30,86%	1,36%

Para la obtención de estos resultados, se debió comparar las absorbancias, con la finalidad de establecer la importancia de la interferencia del sustrato. Los resultados de esta comparación pueden ser observadas en la Tabla VIII.27:

Tabla VIII.27: Comparación de absorbancias con discos de TEGMA/BisGMA a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh.

	Sin células	Con células
Control	0,043	0,202
TEGMA/BisGMA puro	0,062	0,065
TEGMA/BisGMA con 0,5% NPCu	0,062	0,064
TEGMA/BisGMA con 1% NPCu	0,060	0,062

A partir de estos resultados, se realizó un análisis de significancia estadística de medias, a través del Test de Tukey. Estos resultados se presentan en la Tabla VIII.28 y la Tabla VIII.29:

Tabla VIII.28: Análisis estadístico Tukey discos de TEGMA/BisGMA a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células CNh.

Grupos	<i>Control</i>	<i>TB</i>	<i>0,5% NPCu</i>	<i>1,0% NPCu</i>
<i>Control</i>		28,86036	29,03613	29,45796
<i>TB</i>	p<0.01		0,17576	0,59760
<i>0,5% NPCu</i>	p<0.01	n.s.		0,42183
<i>1,0% NPCu</i>	p<0.01	n.s.	n.s.	

Tabla VIII.29: Análisis estadístico Tukey discos de TEGMA/BisGMA a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sin células CNh.

Grupos	<i>Control</i>	<i>TB</i>	<i>0,5% NPCu</i>	<i>1,0% NPCu</i>
<i>Control</i>		-22,77138	-23,36029	-20,80833
<i>TB</i>	p<0.01		-0,58891	1,96305
<i>0,5% NPCu</i>	p<0.01	n.s.		2,55196
<i>1,0% NPCu</i>	p<0.01	n.s.	n.s.	

VIII.3.3. Estudio de Liberación de Iones Cobre

De forma similar que en casos anteriores, se realizaron estudios de lixiviación a las muestras de TEGMA/BisGMA, los cuales se presentan en la Tabla VIII.30:

Tabla VIII.30: Lixiviación de iones cobre [mg/L] desde TEGMA/BisGMA con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].

Tiempo [hr]	Muestra	
	TEGMA/BisGMA 0,5% NPCu	TEGMA/BisGMA 1% NPCu
0	0,0000	0,0000
3	0,0006	0,0022
6	0,0011	0,0039
18	0,0014	0,0053
24	0,0019	0,0075
72	0,0044	0,0114
96	0,0069	0,0158

Adicionalmente, se estudió la tasa de liberación que presenta el TEGMA/BisGMA con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre. Dichos resultados se detallan la Tabla VIII.31:

Tabla VIII.31: Tasa de liberación de iones cobre [mg/L.g de NPCu.hr] desde TEGMA/BisGMA con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].

Tiempo [hr]	Muestra	
	TEGMA/BisGMA 0,5% NPCu	TEGMA/BisGMA 1% NPCu
0	0,0000	0,0000
3	0,1353	0,2706
6	0,1353	0,2368
18	0,0564	0,1071
24	0,0592	0,1142
72	0,0451	0,0578
96	0,0528	0,0602

VIII.4. POLIPROPILENO

Como fue mencionado en el Capítulo V, el polipropileno también fue analizado como posible biomaterial, para lo cual se realizaron diferentes análisis que permitieran discutir respecto a los atributos de dicho elemento. Los resultados asociados a estos análisis, se presentan a continuación.

VIII.4.1. Estudio de Viabilidad Celular con células SAOS-2

A continuación, en la Tabla VIII.32, se presentan los resultados de viabilidad celular para discos de polipropileno sobre células SAOS-2.

Tabla VIII.32: Viabilidad celular con discos de polipropileno a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2.

	Sin interferencia de Polipropileno
Control	100,00%
Polipropileno puro	64,89%
Polipropileno con 10% NPCu	54,96%
Polipropileno con 20% NPCu	58,34%

Para la obtención de lo anterior se llevaron a cabo comparaciones de absorbancias, con el objetivo de determinar la relevancia de la interferencia del sustrato en este estudio. Estas comparaciones se observan en la Tabla VIII.33:

Tabla VIII.33: Comparación de absorbancias con discos de polipropileno a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2.

	Sin células	Con células
Control	0,044	0,153
Polipropileno puro	0,049	0,099
Polipropileno con 10% NPCu	0,046	0,084
Polipropileno con 20% NPCu	0,046	0,089

Los resultados anteriores fueron sometidos a análisis de significancia estadística, mediante la utilización del Test de Tukey. Los resultados se presentan en la Tabla VIII.34 y la Tabla VIII.35, a continuación:

Tabla VIII.34: Análisis estadístico Tukey discos de polipropileno a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre para células SAOS-2.

Grupos	<i>Control</i>	<i>Polipropileno</i>	<i>10% NPCu</i>	<i>20% NPCu</i>
<i>Control</i>		24,48475	31,40435	29,04712
<i>Polipropileno</i>	p<0.01		6,91960	4,56237
<i>10% NPCu</i>	p<0.01	p<0.01		-2,35723
<i>20% NPCu</i>	p<0.01	p<0.05	n.s.	

Tabla VIII.35: Análisis estadístico Tukey discos de polipropileno a diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sin células SAOS-2.

Grupos	<i>Control</i>	<i>Polipropileno</i>	<i>10% NPCu</i>	<i>20% NPCu</i>
<i>Control</i>		-3,13197	-1,14839	-1,46159
<i>Polipropileno</i>	n.s.		1,98358	1,67039
<i>10% NPCu</i>	n.s.	n.s.		-0,31320
<i>20% NPCu</i>	n.s.	n.s.	n.s.	

VIII.4.2. Estudio de Liberación de Iones Cobre

También, se realizaron estudios de lixiviación al polipropileno, los cuales se presentan en la Tabla VIII.36:

Tabla VIII.36: Lixiviación de iones cobre [mg/L] desde polipropileno con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].

Tiempo [hr]	Muestra	
	Polipropileno 10% NPCu	Polipropileno 20% NPCu
0	0,0000	0,0000
3	0,0006	0,0019
6	0,0008	0,0028
18	0,0014	0,0039
24	0,0014	0,0039
72	0,0019	0,0064
96	0,0028	0,0086

Adicionalmente, se estudió la tasa de liberación que presenta el Polipropileno con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre. Dichos resultados se detallan en la Tabla VIII.37:

Tabla VIII.37: Tasa de liberación de iones cobre [mg/L.g de NPCu.hr] desde polipropileno con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].

Tiempo [hr]	Muestra	
	Polipropileno 10% NPCu	Polipropileno 20% NPCu
0	0,0000	0,0000
3	0,0036	0,0054
6	0,0027	0,0038
18	0,0015	0,0018
24	0,0011	0,0013
72	0,0005	0,0007
96	0,0006	0,0007

VIII.5. NANOPARTÍCULAS DE COBRE

Para poder realizar un estudio acabado de los nanocompuestos estudiados, se analizó la liberación de iones cobre, a partir de nanopartículas de cobre directamente sumergidas en agua desionizada.

VIII.5.1. Estudio de Liberación de Iones Cobre

A continuación, en la Tabla VIII.38 y la Tabla VIII.39, se presentan los resultados de lixiviación realizados a nanopartículas de cobre puro, 0,05 [g] y 0,025 [g], así como los hallazgos obtenidos respecto a la tasa de liberación que presentan nanopartículas de cobre directamente sumergidas en agua desionizada

Tabla VIII.38: Lixiviación de iones cobre [mg/L] desde nanopartículas de cobre directamente sumergidas en agua desionizada durante 96 [hr].

Tiempo [hr]	Muestra	
	NPCu 0,05 [g]	NPCu 0,025 [g]
0	0,0000	0,0000
3	0,0335	0,0213
6	0,0920	0,0584
18	0,1742	0,1219
24	0,2590	0,1997
72	0,3607	0,2889
96	0,4789	0,3817

Tabla VIII.39: Tasa de liberación de iones cobre [mg/L.g de NPCu.hr] desde nanopartículas de cobre directamente sumergidas en agua desionizada durante 96 [hr].

Tiempo [hr]	Muestra	
	NPCu 0,05 [g]	NPCu 0,025 [g]
0	0,0000	0,0000
3	0,2235	0,2844
6	0,3066	0,3897
18	0,1936	0,2709
24	0,2158	0,3329
72	0,1002	0,1605
96	0,0528	0,0602

VIII.5.2. Comparación de Liberación de Iones Cobre

Como complemento a lo anterior, se realizó una normalización de los resultados ya mostrados. Dicha normalización fue realizada en función de los gramos añadidos de nanopartículas de cobre en cada muestra.

Los resultados se presentan en la Tabla VIII.40, Tabla VIII.41, Tabla VIII.42, Tabla VIII.43, Tabla VIII.44:

Tabla VIII.40: Lixiviación de iones cobre [mg/L.g de NPCu] desde esferas de alginato con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].

Tiempo [hr]	Muestra				
	2% Alg. 1% NPCu	2% Alg. 3% NPCu	2% Alg. 5% NPCu	2% Alg. 7% NPCu	2% Alg. 9% NPCu
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
3	20,7756	8,3102	4,1551	3,5615	3,2318
6	37,3961	15,2355	9,9723	7,7167	7,3869
18	45,7064	19,3906	13,2964	10,0910	9,6953
24	66,4820	26,3158	18,2825	13,6526	12,9271
72	95,5679	34,6260	21,6066	17,2141	14,7738
96	112,1884	38,7812	24,9307	20,7756	18,9289

Tabla VIII.41: Lixiviación de iones cobre [mg/L.g de NPCu] desde alginato seco con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].

Tiempo [hr]	Muestra	
	2% Alg. 1% NPCu	2% Alg. 5% NPCu
0	0,0000	0,0000
3	33,2410	4,9861
6	41,5512	6,6482
18	49,8615	12,4654
24	62,3269	14,1274
72	83,1025	19,9446
96	91,4127	25,7618

Tabla VIII.42: Lixiviación de iones cobre [mg/L.g de NPCu] desde TEGMA/BisGMA con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].

Tiempo [hr]	Muestra	
	TEGMA/BisGMA 0,5% NPCu	TEGMA/BisGMA 1% NPCu
0	0,0000	0,0000
3	0,4059	0,8117
6	0,8117	1,4206
18	1,0147	1,9279
24	1,4206	2,7396
72	3,2470	4,1602
96	5,0734	5,7837

Tabla VIII.43: Lixiviación de iones cobre [mg/L.g de NPCu] desde polipropileno con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre a agua desionizada durante 96 [hr].

Tiempo [hr]	Muestra	
	Polipropileno 10% NPCu	Polipropileno 20% NPCu
0	0,0000	0,0000
3	0,0107	0,0162
6	0,0160	0,0231
18	0,0266	0,0323
24	0,0266	0,0323
72	0,0373	0,0531
96	0,0533	0,0716

Tabla VIII.44: Lixiviación de iones cobre [mg/L.g de NPCu] desde nanopartículas de cobre directamente sumergidas en agua desionizada durante 96 [hr].

Tiempo [hr]	Muestra	
	NPCu 0,05 [g]	NPCu 0,025 [g]
0	0,0000	0,0000
3	0,6704	0,8532
6	1,8393	2,3380
18	3,4848	4,8753
24	5,1801	7,9889
72	7,2133	11,5568
96	9,5789	15,2687

Para realizar un análisis más acabado del efecto de liberación de iones cobre respecto a la concentración de éste contenido en cada matriz, se realizó un estudio para cada compósito polimérico. Los resultados asociados a estos estudios se presentan en la Tabla VIII.45, Tabla VIII.46, Tabla VIII.47, Tabla VIII.48 y Tabla VIII.49.

Tabla VIII.45: Efecto de nanopartículas de cobre en matriz de alginato húmedo sobre liberación normalizada de iones cobre a las 24 horas.

	NPCu [grs]	Liberación [mg/L.g de NPCu]
Alginato 2% - NPCu 1%	0,000067	66,4820
Alginato 2% - NPCu 3%	0,000200	26,3158
Alginato 2% - NPCu 5%	0,000333	18,2825
Alginato 2% - NPCu 7%	0,000467	13,6526
Alginato 2% - NPCu 9%	0,000600	12,9271

Tabla VIII.46: Efecto de nanopartículas de cobre en matriz de alginato seco sobre liberación normalizada de iones cobre a las 24 horas.

	NPCu [grs]	Liberación [mg/L.g de NPCu]
Alginato Seco 2% - NPCu 1%	0,000067	62,3269
Alginato Seco 2% - NPCu 5%	0,000333	14,1274

Tabla VIII.47: Efecto de nanopartículas de cobre en matriz de TEGMA/BisGMA sobre liberación normalizada de iones cobre a las 24 horas.

	NpCu [grs]	Liberación [mg/L.g de NPCu]
TEGMA/BisGMA - NPCu 0,5%	0,0014	1,4206
TEGMA/BisGMA - NPCu 1%	0,0027	2,7396

Tabla VIII.48: Efecto de nanopartículas de cobre en matriz de polipropileno sobre liberación normalizada de iones cobre a las 24 horas.

	NPCu [grs]	Liberación [mg/L.g de NPCu]
Polipropileno - NPCu 10%	0,0520	0,0373
Polipropileno - NPCu 20%	0,1200	0,0208

Tabla VIII.49: Efecto de nanopartículas de cobre sumergidas en agua desionizada sobre liberación normalizada de iones cobre a las 24 horas.

	NPCu [grs]	Liberación [mg/L.g de NPCu]
NPCu 0,05g	0,0500	0,2158
NPCu 0,025g	0,0250	0,3329

Adicionalmente, se realizaron experimentos para estudiar algunos fenómenos que se encuentran relacionados con la lixiviación de iones. Los resultados asociados a estos análisis se presentan en la Tabla VIII.50 y Tabla VIII.51.

Tabla VIII.50: Variación de diámetro de esferas de alginato con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sumergidas en agua desionizada durante 96 [hr].

Tiempo [hr]	Muestra					
	2% Alg.	2% Alg. 1% NPCu	2% Alg. 3% NPCu	2% Alg. 5% NPCu	2% Alg. 7% NPCu	2% Alg. 9% NPCu
0	4,0000	4,0000	4,0000	4,0000	4,0000	4,0000
3	5,6333	5,0333	4,7333	4,6333	4,4000	4,1667
6	5,9000	5,3333	5,1667	4,9667	4,7333	4,6333
18	6,5667	5,7667	5,5333	5,4333	5,0667	4,8667
24	6,7667	5,9000	5,7333	5,5667	5,2333	5,0667
72	6,8333	5,9667	5,7333	5,6333	5,3000	5,2333
96	6,9333	6,0667	5,8333	5,6667	5,3667	5,2667

Tabla VIII.51: Variación de pesos de esferas de alginato con diferentes concentraciones de nanopartículas de cobre sumergidas en agua desionizada durante 96 [hr].

Tiempo [hr]	Muestra		
	2% Alg.	2% Alg. 1% NPCu	2% Alg. 5% NPCu
0	0,0036	0,0020	0,0021
3	0,0413	0,0382	0,0363
6	0,0496	0,0456	0,0447
18	0,0601	0,0518	0,0474
24	0,0673	0,0541	0,0503
72	0,0696	0,0557	0,0516
96	0,0702	0,0574	0,0531