



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

ESTUDIO DE LA BIOCMPATIBILIDAD DE COMPÓSITOS POLIMÉRICOS CON NANOPARTÍCULAS DE COBRE

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL QUÍMICA

MACARENA FLORENCIA BELTRÁN CARPENTIER

PROFESOR GUIA:
HUMBERTO PALZA CORDERO

MIEMBROS DE LA COMISION:
PABLO CAVIEDES FERNÁNDEZ
BÁRBARA ANDREWS FARROW

SANTIAGO DE CHILE
ABRIL 2013

RESUMEN EJECUTIVO
MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL QUIMICA
AUTORA: MACARENA FLORENCIA BELTRÁN CARPENTIER
SANTIAGO, ABRIL 2013
PROF. GUIA: HUMBERTO PALZA CORDERO

**“ESTUDIO DE LA BIOCMPATIBILIDAD DE COMPÓSITOS POLIMÉRICOS CON
NANOPARTÍCULAS DE COBRE”**

Últimamente, ha aumentado el interés de científicos e investigadores por los materiales poliméricos con propiedades antibacterianas, es decir, polímeros a los que se les incorpora un agente biocida, como el cobre, durante su procesamiento. Este interés radica en que estos compósitos bactericidas pueden ser un gran avance para la medicina. En este contexto surge la inquietud de evaluar el comportamiento de las células eucariotas en presencia de este tipo de compósito para asegurar que sean inocuos para el organismo humano.

El objetivo de memoria de título fue estudiar el efecto de las nanopartículas de cobre sobre la bioreactividad de una matriz polimérica. Para esto, se evaluó la citotoxicidad de compósitos de polipropileno y alginato con nanopartículas de cobre sobre líneas celulares normales y tumorales de animales. Se implementaron las metodologías MTT y Live/Dead, que permitieron estudiar la citotoxicidad de estos compósitos.

Los nanocompósitos de polipropileno no resultaron ser tóxicos, en general, para las líneas celulares. Los compósitos de alginato, en cambio, fueron citotóxicos a bajas concentraciones de nanopartículas de cobre ya que, por su característica de hidrogel, tienen una tasa de liberación de iones cobre que resulta tóxica para las células. Se obtuvo que la tasa de liberación crítica de cobre, en agua, se encuentra en el intervalo [0,76; 1,1] [mg/L]. Para desarrollar compósitos con cobre biocompatibles se requiere de una matriz polimérica capaz de controlar la liberación de iones cobre, de tal forma de no superar esta tasa crítica, como el polipropileno.

El futuro desarrollo de los compósitos bactericidas, evaluados en este trabajo, es muy importante para su aplicación en artículos médicos y en diferentes tipos de implantes y así reducir las infecciones intrahospitalarias.

Agradecimientos

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

A mis compañeros del laboratorio de polímeros, en especial a Juanito, por la paciencia para responder mis dudas y la buena onda.

A mis compañeros del laboratorio de medicina, en especial a Guille y a Reymond, por acogerme desde el primer día y hacerme sentir como si llevara mucho tiempo trabajando allí y los conociera de toda la vida.

A mis compañeros iqbetitos: Made, Pili, Claudia, Feña, Garfield, Waldo, Huepe y Moises, a mis amigos de primer año: Los Machines, a mi comunidad: Fran, Cesar, Coté y Angie; y a mis compañeras de colegio: Paz, Claudia, Ro, Melon, Mile y Vale. A todos ellos, por su amistad incondicional, por su hermosa compañía y por alegrar mi vida todos los días. Por saber que siempre puedo contar con ustedes.

A mi mamá por aguantar mi malgenio en los momentos de colapso y estrés. Gracias mami por escucharme y apoyarme siempre, por ser mi amiga. Por exigirme todos los días para conseguir que sea la persona que soy ahora. Te adoro mamá.

A mi papá por su cariño y su intento por que nos tomáramos las obligaciones académicas de una forma más relajada. Gracias por ser mi compañero incondicional para los partidos de futbol y compartir conmigo esa pasión. Gracias también por toda la ayuda brindada en este trabajo, eres el mejor.

A mis hermanos, los mejores que me pudieron haber tocado. Gracias Pabli por esas conversaciones de hermanos que solucionan todos los problemas. Gracias por llegar a hostigarme con tus muestras de afecto. Gracias Cotito por ser el angelito que me acompaña desde arriba y que me muestra que nunca estoy ni estaré sola.

Tabla de Contenido

Capítulo I	Introducción.....	1
I.1	Antecedentes Generales.....	1
I.1.1	Infecciones Intrahospitalarias.....	1
I.1.2	Infecciones asociadas a implantes	2
I.1.3	Metales antimicrobianos	3
I.2	Cobre como Biocida.....	3
I.2.1	El cobre metálico: Propiedades y aplicaciones.....	3
I.2.2	Mercado del Cobre.....	6
I.2.3	El cobre como bactericida.....	7
I.2.4	Nanotecnología y Nanopartículas de Cobre	9
I.3	Compósitos Poliméricos	11
I.3.1	Nanocompósitos antimicrobianos	11
I.3.2	Polipropileno	12
I.3.3	Alginato	15
I.3.4	Métodos de Fabricación.....	16
I.3.4.1	Mezclado por Fundido.....	16
I.3.4.2	Nanocompósitos en solución	17
I.4	Bioreactividad del Cobre	17
I.4.1	Cultivos celulares	17
I.4.1.1	Líneas celulares.....	19
I.4.2	Ensayos de Citotoxicidad.....	19
I.4.2.1	Ensayo de viabilidad celular MTT	20
I.4.2.2	Ensayo de viabilidad celular Live/Dead	22
I.4.3	Estudios de Citotoxicidad del cobre	24
I.5	Motivación y Alcances del Trabajo de Título.....	28
I.5.1	Motivación	28
I.5.2	Alcances.....	28
I.5.3	Descripción del Proyecto	29
I.6	Hipótesis de trabajo	29
Capítulo II	Objetivos	31

II.1	Objetivo General	31
II.2	Objetivos Específicos	31
Capítulo III Parte Experimental		32
III.1	Lavado de Nanopartículas de cobre	32
III.2	Preparación de Nanocompuestos Poliméricos	33
III.2.1	Polipropileno	33
III.2.1.1	Reactivos y Equipos.....	33
III.2.1.2	Procedimiento	35
III.2.1.3	Polímero Funcionalizado.....	36
III.2.1.4	Polímero con gelatina	36
III.2.2	Alginato	37
III.2.2.1	Materiales y Equipos.....	37
III.2.2.2	Solución de Alginato con Nanopartículas de Cobre.....	37
III.2.2.3	Hidrogeles de Alginato	38
III.2.2.4	Films de Alginato.....	39
III.3	Preparación de las placas de cultivo con las muestras de nanocompuestos poliméricos	39
III.3.1	Materiales y Equipos.....	39
III.3.2	Procedimiento	40
III.4	Preparación de Reactivos principales para los Cultivos Celulares	40
III.4.1	Medio de Cultivo	40
III.4.1.1	Medio de cultivo sin suero.....	41
III.4.1.2	Medio de cultivo con suero	41
III.4.2	Solución D.....	42
III.4.3	Tripsina	43
III.5	Preparación de Cultivos Celulares para Ensayos de citotoxicidad	43
III.5.1	Materiales y Equipos.....	43
III.5.2	Procedimiento	43
III.6	Preparación de subcultivos para Ensayos de Citotoxicidad	44
III.6.1	Materiales y Equipos.....	44
III.6.2	Procedimiento	44
III.7	Ensayos de Viabilidad Celular	46
III.7.1	Metodología MTT	46
III.7.1.1	Materiales y Equipos.....	46

III.7.1.2	Procedimiento	47
III.7.2	Metodología Live/Dead	48
III.7.2.1	Materiales y Equipos	48
III.7.2.2	Procedimiento	49
III.8	Ensayo de Liberación de Iones Cobre	50
III.8.1	Materiales y Equipos	50
III.8.2	Procedimiento	51
III.9	Análisis Estadístico de Tukey	54
Capítulo IV	Resultados y Discusión	55
IV.1	Citotoxicidad de compósitos de polipropileno con nanopartículas de cobre por ensayo MTT: Estudio sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh)55	
IV.1.1	Polybond como matriz polimérica	57
IV.1.2	Estudios complementarios de evaluación de adherencia celular del polipropileno	59
IV.1.3	Ensayos de modificación de la superficie del polipropileno.....	61
IV.1.4	Resumen de resultados de citotoxicidad de compósitos de polipropileno sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh).....	64
IV.2	Citotoxicidad de compósitos de polipropileno con nanopartículas de cobre por ensayo Live/Dead: Estudio sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh)	65
IV.3	Citotoxicidad del polipropileno con nanopartículas de cobre en un periodo de tiempo más prolongado (96 horas): Estudio sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh)	68
IV.3.1	Comparación de citotoxicidad de las muestras de polipropileno sobre células CNh en 24 horas y en 96 horas.....	70
IV.4	Citotoxicidad de polipropileno con nanopartículas de cobre: Estudio sobre células tumorales endocrinas de la tiroides (UCHT1).....	71
IV.4.1	Ensayo MTT	71
IV.4.1.1	Comparación de citotoxicidad de las muestras de polipropileno sobre células CNh y UCHT1	73
IV.4.2	Ensayo Live/Dead.....	74

IV.5 Citotoxicidad del polipropileno con nanopartículas de cobre en un periodo de tiempo más prolongado (96 horas): Estudio sobre células tumorales endocrinas de la tiroides (UCHT1)	76
IV.5.1 Comparación de citotoxicidad de las muestras de polipropileno sobre células UCHT1 en 24 horas y en 96 horas	78
IV.6 Citotoxicidad del polipropileno con nanopartículas de cobre: Ensayo de liberación de iones cobre.....	80
IV.7 Citotoxicidad de compósitos de alginato con nanopartículas de cobre: Estudio sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh)	82
IV.7.1 Desarrollo de compósitos de Alginato	82
IV.7.2 Ensayo MTT	83
IV.8 Citotoxicidad de compósitos de alginato con nanopartículas de cobre: Estudio sobre células tumorales endocrinas de la tiroides (UCHT1).....	85
IV.8.1 Comparación de citotoxicidad de las muestras de alginato sobre células CNh y UCHT1	86
IV.9 Citotoxicidad del cloruro de bario y alginato puro: Estudio sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh).....	88
IV.10 Citotoxicidad de compósitos de alginato con nanopartículas de cobre preparados en una solución de PBS: Estudio sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh)	89
IV.11 Citotoxicidad del alginato con nanopartículas de cobre: Ensayo de liberación de iones cobre.....	91
IV.12 Citotoxicidad de las nanopartículas de cobre: Estudio sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh).....	93
IV.12.1 Ensayo MTT	94
IV.12.2 Ensayo de liberación de iones cobre.....	95
IV.13 Comparación de resultados de citotoxicidad de las matrices poliméricas de Polipropileno y Alginato según los estudios de liberación de iones cobre.....	96
Capítulo V Conclusiones	99
Capítulo VI Bibliografía	101
Capítulo VII Anexos	105

VII.1 Análisis Estadístico de Tukey	105
VII.1.1 ANOVA	105
VII.1.2 Prueba de Tukey	106
VII.2 Citotoxicidad de compósitos de polipropileno con nanopartículas de cobre por ensayo MTT: Estudio sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh)	107
VII.3 Adherencia celular en compósitos poliméricos de polipropileno	108
VII.4 Citotoxicidad del polipropileno con nanopartículas de cobre en un periodo de tiempo más prolongado (96 horas): Estudio sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh)	110
VII.5 Citotoxicidad de polipropileno con nanopartículas de cobre: Estudio sobre células tumorales endocrinas de la tiroides (UCHT1)	110
VII.6 Citotoxicidad del polipropileno con nanopartículas de cobre en un periodo de tiempo más prolongado (96 horas): Estudio sobre células tumorales endocrinas de la tiroides (UCHT1)	111
VII.7 Citotoxicidad del polipropileno con nanopartículas de cobre: Ensayo de liberación de iones cobre	111
VII.8 Citotoxicidad de compósitos de alginato con nanopartículas de cobre: Estudio sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh)	112
VII.9 Citotoxicidad de compósitos de alginato con nanopartículas de cobre: Estudio sobre células tumorales endocrinas de la tiroides (UCHT1)	112
VII.10 Citotoxicidad del alginato con nanopartículas de cobre: Ensayo de liberación de iones cobre	113

Índice de Figuras

<i>Figura 1. Principales usos del cobre a nivel mundial</i>	<i>4</i>
<i>Figura 2. Relación dosis de cobre y sus efectos</i>	<i>5</i>
<i>Figura 3. Evolución mundial de la producción de cobre durante el período 1985-2011 (millones de TM)</i>	<i>6</i>

<i>Figura 4. Evolución de principales países demandantes de cobre en el periodo 1976-2011 (millones de TM).....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 5. Mecanismo de inactivación de una bacteria con cobre.</i>	<i>9</i>
<i>Figura 6. Comparación de la velocidad de liberación de iones cobre para micropartículas y nanopartículas [14].....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 7. Efecto de la concentración de nanopartículas de cobre en la matriz de polipropileno sobre el tiempo requerido para matar el 50% de Escherichia coli [5]......</i>	<i>12</i>
<i>Figura 8. Obtención de Polipropileno [17].</i>	<i>13</i>
<i>Figura 9. Tipos de polipropileno [17].</i>	<i>13</i>
<i>Figura 10. Componentes de los alginatos: Bloques G-G, M-M y G-M.</i>	<i>15</i>
<i>Figura 11. Evolución de una línea celular [25].</i>	<i>18</i>
<i>Figura 12. Reducción del MTT a Formazan por la acción de una enzima mitocondrial.</i>	<i>21</i>
<i>Figura 13. Diagrama principio MTT.</i>	<i>21</i>
<i>Figura 14. Diagrama principio Live/Dead.</i>	<i>23</i>
<i>Figura 15. Resultados ensayo MTT en el estudio sobre la citotoxicidad de CuHa sintetizado por intercambio iónico en solución acuosa [30].</i>	<i>24</i>
<i>Figura 16. Resultado ensayo MTT en el estudio de de nanopartículas de cobre en una matriz de polisacárido [31].</i>	<i>25</i>
<i>Figura 17. Efecto del cobre sobre la proliferación de células endoteliales (líneas continua y discontinua), células de músculo liso (línea punteada) y fibroblastos (línea encadenada) [33].</i>	<i>27</i>
<i>Figura 18. Estructura química del Polybond.</i>	<i>34</i>
<i>Figura 19. Hidrogeles de alginato esféricos (Diámetro de la esfera: 6 mm aproximadamente).</i>	<i>38</i>
<i>Figura 20. Diagrama Placa Cultivo Celular.</i>	<i>45</i>
<i>Figura 21. Diagrama de un pocillo de subcultivo para ensayos de viabilidad celular. ...</i>	<i>46</i>
<i>Figura 22. Diagrama de Procedimiento para Ensayo de Viabilidad Celular MTT.</i>	<i>48</i>
<i>Figura 23. Diagrama de Procedimiento para Ensayo de Viabilidad Celular Live/Dead.</i>	<i>50</i>
<i>Figura 24. Comparación de la estructura del polipropileno y del polipropileno injertado con anhídrido maleico.</i>	<i>59</i>
<i>Figura 25. Imágenes de Microscopio de Fluorescencia del ensayo Live/Dead para células CNh para (I) Polipropileno Blanco, (II) Polipropileno con 10% de NPCu, (III)</i>	

<i>Polipropileno con 20% de NPCu, (IV) Polybond con 50% de NPCu. a- Fluorescencia Verde para células vivas; b- Fluorescencia Roja para células muertas.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 26. Contador de células de Image J para la muestra de polipropileno blanco. ..</i>	<i>67</i>
<i>Figura 27. Imágenes de Microscopio de Fluorescencia del ensayo Live/Dead para células UCHT1 para (I) Polipropileno Blanco, (II) Polipropileno con 10% de NPCu, (III) Polipropileno con 20% de NPCu, (IV) Polybond con 50% de NPCu. a- Fluorescencia Verde para células vivas; b- Fluorescencia Roja para células muertas.....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 28. Compósitos desarrollados de (a) alginato puro, (b) alginato con 5% de NPCu, (c) alginato con 10% de NPCu (Diámetro de la esfera: 6 mm aproximadamente).</i>	<i>83</i>
<i>Figura 29. Diagrama general de un experimento a analizar por ANOVA [35].</i>	<i>105</i>
<i>Figura 30. Diagrama de las hipótesis del análisis de la varianza [35].....</i>	<i>106</i>

Índice de Gráficos

<i>Gráfico 1. Curva de calibración del espectrofotómetro</i>	<i>53</i>
<i>Gráfico 2. Viabilidad celular de los cultivos de CNh en presencia de polipropileno con nanopartículas de cobre. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): p<0.01 comparado con el control y comparado con la muestra de MB 50% de NPCu.....</i>	<i>56</i>
<i>Gráfico 3. Viabilidad celular de los cultivos de CNh en presencia de los Polímeros Polybond y Masterbatch 50% NPCu. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): p<0.01 comparado con el control, (**): p<0.01 comparado con la muestra de PP blanco, (***): p<0.05 comparado con la muestra de PP blanco.</i>	<i>58</i>
<i>Gráfico 4. Viabilidad celular de los cultivos de CNh en la placa donde se retiró el polímero. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): p<0.01 comparado con el control.....</i>	<i>60</i>
<i>Gráfico 5. Viabilidad celular de los cultivos de CNh en la placa con las muestras poliméricas. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): p<0.01 comparado con el control.....</i>	<i>60</i>
<i>Gráfico 6. Viabilidad celular de los cultivos de CNh en presencia de polímeros modificados para mejorar la adherencia celular. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): p<0.01 comparado con el control, (**): p<0.05 comparado con la muestra de PP con 20% de NPCu sin modificar, (***): p<0.01 comparado con la muestra de PP con 20% de NPCu sin modificar.....</i>	<i>62</i>

Gráfico 7. Viabilidad celular de los cultivos CNh en la placa donde se retiró el polímero modificado. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): $p < 0.01$ comparado con el control.....	63
Gráfico 8. Viabilidad celular de los cultivos CNh en la placa con las muestras poliméricas modificadas. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): $p < 0.01$ comparado con el control.....	63
Gráfico 9. Viabilidad celular de los cultivos de CNh en presencia de polipropileno con NPCu en 96 horas. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): $p < 0.05$ comparado con el control, (**): $p < 0.01$ comparado con el control.....	69
Gráfico 10. Viabilidad celular de los cultivos de CNh en presencia de los compósitos de polipropileno por 24 y 96 horas. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): $p < 0.01$ comparado con el control, (**): $p < 0.01$ comparado con la muestra de 24 horas de masterbatch con 50% NPCu.....	70
Gráfico 11. Viabilidad celular de los cultivos de UCHT1 en presencia del polipropileno con nanopartículas de cobre. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): $p < 0.01$ comparado con el control y con la muestra de MB con 50% de NPCu, (**): $p < 0.01$ comparado con el control y $p < 0.05$ comparado con la muestra de MB con 50% de NPCu.....	72
Gráfico 12. Viabilidad celular de diferentes cultivos celulares (CNh y UCHT1) en presencia del polipropileno con nanopartículas de cobre. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): $p < 0.01$ comparado con el control, (**): $p < 0.05$ comparado con el control.....	74
Gráfico 13. Viabilidad celular de los cultivos de UCHT1 en presencia del polipropileno con NPCu por 96 horas. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): $p < 0.01$ comparado con el control, (**): $p < 0.01$ comparado con la muestra de MB con 50% de NPCu.....	77
Gráfico 14. Viabilidad celular de los cultivos de UCHT1 en presencia de los compósitos de polipropileno por 24 y 96 horas. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): $p < 0.01$ comparado con el control, (*): $p < 0,05$ comparado con la muestra de 96 horas de PP blanco, (**): $p < 0.01$ comparado con la muestra de 96 horas de PP con 10% de NPCu, (**): $p < 0.01$ comparado con la muestra de 96 horas de PP con 20% de NPCu, (**): $p < 0.01$ comparado con la muestra de 96 horas de MB con 50% de NPCu.....	79
Gráfico 15. Lixiviación de iones cobre de los compósitos de polipropileno con 10% y 20% de NPCu y polybond con 50% de NPCu.....	80
Gráfico 16. Viabilidad celular de los cultivos de CNh en presencia del alginato con nanopartículas de cobre. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): $p < 0.01$ comparado con el	

control, (**): $p < 0.01$ comparado con la muestra alginato blanco, (***): $p < 0.01$ comparado con la muestra de alginato con 1% de NPCu y $p < 0.05$ comparado con la muestra de alginato con 3% de NPCu.	84
Gráfico 17. Viabilidad celular de los cultivos de UCHT1 en presencia del alginato con nanopartículas de cobre. Datos = Promedio + SD; $n=6$; (*): $p < 0.01$ comparado con el control, (**): $p < 0.01$ comparado con la muestra alginato blanco y con la muestra de alginato con 1% de NPCu.	86
Gráfico 18. Viabilidad celular de diferentes cultivos celulares (CNh y UCHT1) en presencia del alginato con nanopartículas de cobre. Datos = Promedio + SD; $n=6$; (*): $p < 0.01$ comparado con el control.	87
Gráfico 19. Citotoxicidad del alginato puro y el cloruro de bario. Datos = Promedio + SD; $n=6$; (*): $p < 0.01$ comparado con el control.	88
Gráfico 20. Comparación de la viabilidad celular de los cultivos de CNh en presencia de compósitos de alginato blanco preparados con agua destilada y PBS. Datos = Promedio + SD; $n=6$; (*): $p < 0.01$ comparado con el control, (**): $p < 0.01$ comparado con el compósito de alginato blanco preparado con PBS.	90
Gráfico 21. Lixiviación de iones cobre de los compósitos de alginato con 1%, 3%, 5%, 8% y 10% de NPCu.	91
Gráfico 22. Viabilidad celular de los cultivos de CNh en presencia de las nanopartículas de cobre comerciales. Datos = Promedio + SD; $n=6$; (*): $p < 0.01$ comparado con el control.	94
Gráfico 23. Lixiviación de iones cobre de las nanopartículas de cobre comerciales.	95
Gráfico 24. Comparación de la liberación de iones cobre de los compósitos poliméricos evaluados.	97

Índice de Tablas

Tabla 1. Dosis recomendada y límite máximo de cobre por día.	5
Tabla 2. Resumen de principales propiedades del polipropileno.	14
Tabla 3. Resumen de ensayos de viabilidad celular.	20
Tabla 4. Características de Polipropileno PH0320.	33

<i>Tabla 5. Propiedades del Polybond 3200.</i>	34
<i>Tabla 6. Composición del Medio de Cultivo sin suero.</i>	41
<i>Tabla 7. Composición del Medio de Cultivo con suero.</i>	41
<i>Tabla 8. Composición de la Solución D.</i>	42
<i>Tabla 9. Resumen de los porcentajes de viabilidad celular de los cultivos de CNh en presencia de los compósitos de polipropileno.</i>	64
<i>Tabla 10. Resultado ensayo Live/Dead para el polipropileno con nanopartículas de cobre para células CNh.</i>	68
<i>Tabla 11. Resultado ensayo Live/Dead para el polipropileno con nanopartículas de cobre para células UCHT1.</i>	76
<i>Tabla 12. Cantidad de NPCu en los discos y concentración de iones cobre liberada cada uno de los discos de polipropileno en agua destilada.</i>	81
<i>Tabla 13. Cantidad de NPCu en las esferas y concentración de iones cobre liberada por cada una de las esferas de alginato en agua destilada.</i>	92
<i>Tabla 14. Concentración de cobre liberada por 20 [mg] de nanopartículas de cobre comerciales.</i>	96
<i>Tabla 15. Viabilidad Celular del polipropileno con nanopartículas de cobre.</i>	107
<i>Tabla 16. Viabilidad Celular de los Polímeros Polybond y Masterbatch 50% NPCu.</i>	108
<i>Tabla 17. Viabilidad celular de la placa donde se retiró el polímero.</i>	108
<i>Tabla 18. Viabilidad celular de la placa con las muestras poliméricas.</i>	108
<i>Tabla 19. Viabilidad Celular de los Polímeros modificados para mejorar la adherencia celular.</i>	109
<i>Tabla 20. Viabilidad celular de la placa donde se retiró el polímero modificado.</i>	109
<i>Tabla 21. Viabilidad celular de la placa con las muestras poliméricas modificadas.</i>	109
<i>Tabla 22. Viabilidad celular del polipropileno con NPCu en 96 horas.</i>	110
<i>Tabla 23. Viabilidad Celular del polipropileno con nanopartículas de cobre para células UCHT1.</i>	110
<i>Tabla 24. Viabilidad celular del polipropileno con NPCu en 96 horas para células UCHT1.</i>	111
<i>Tabla 25. Lixiviación de iones cobre de los compósitos de polipropileno con 10% y 20% de NPCu y polybond con 50% de NPCu en [mg/L.cm²].</i>	111

<i>Tabla 26. Viabilidad Celular del alginato con nanopartículas de cobre para células CNh.</i>	112
<i>Tabla 27. Viabilidad Celular del alginato con nanopartículas de cobre para células UCHT1.</i>	112
<i>Tabla 28. Lixiviación de iones cobre de los compósitos de alginato con 1%, 3%, 5%, 8% y 10% de NPCu en [mg/L.g].</i>	113

Capítulo I Introducción

I.1 **Antecedentes Generales**

I.1.1 **Infecciones Intrahospitalarias**

Un grave problema en los hospitales o recintos de atención a la salud hoy en día son las infecciones nosocomiales, más conocidas como infecciones intrahospitalarias (IIH). Entendemos por infecciones intrahospitalarias todas aquellas adquiridas por el paciente durante su estancia en el recinto hospitalario y que no son causa de su ingreso. En los últimos años, las infecciones bacterianas se han vuelto una gran amenaza para la salud humana en los diferentes centros de atención hospitalaria, tanto por la contaminación bacteriana de artículos médicos como para los pacientes hospitalizados [1]. Se sabe que el 5-10% de los pacientes hospitalizados contrae alguna infección intrahospitalaria. Esto corresponde en Chile a alrededor de 70.000 pacientes con IIH anuales. Además se estima que cada IIH alarga 10 días la estadía hospitalaria de un paciente lo que significaría 700.000 días cama utilizados en IIH y un aumento notable en los costos para el país. Las infecciones nosocomiales son la séptima causa de muerte en el mundo [2]. En Estados Unidos se notifican alrededor de 2 millones de casos de infecciones nosocomiales al año y, en ese país, se estima que cada IIH alarga 5 días la estadía de un paciente en el recinto (específicamente 7,5 días para heridas operatorias; 7 a 21 días para bacteriemias; 6,8 a 30 días para neumonías y 1 a 4 días para infecciones urinarias) [2].

Un tipo de IIH son las asociadas a implantes. Estos dispositivos tienen asociado un riesgo, no menor, de infectarse con graves consecuencias para los pacientes que pueden llegar a la muerte. Los dispositivos de implantes corresponden actualmente a alrededor del 45% de todas las infecciones nosocomiales [3].

I.1.2 Infecciones asociadas a implantes

Un implante es un material inerte que se inserta parcial o totalmente en el cuerpo humano, con finalidad generalmente terapéutica pero que también puede tener fines estéticos. Tienen que cumplir con diversos requisitos tales como: ser no carcinógenos, no tóxicos, no alergénicos, no inmunogénicos, químicamente estables (no presentar degradación en el tiempo), tener resistencia mecánica y tiempo de fatiga adecuados y biocompatibles. Se clasifican en: metálicos, cerámicos, polímeros y biológicos.

La inserción de dispositivos como implantes se ha convertido en una técnica indispensable para el desarrollo de la medicina. Este tipo de biomateriales se utilizan en diversos campos de la medicina tales como:

- Intravascular: Catéteres.
- Cardiovascular: Injertos vasculares, corazón, válvulas de corazón, marcapasos, dispositivos de asistencia ventricular (VAD).
- Sistema Respiratorio: laringe, tráquea, diafragma, pulmones, caja torácica.
- Ortopedia: Caderas, rodillas, hombros y articulación del dedo.
- Ginecología: Implantes mamarios,
- Oftalmología: Lentes intraoculares, lentes de contacto e implantes de retina.
- Dental: Implantes dentales.

En Estados Unidos se insertan 835.000 implantes cardiovasculares al año, 2.600.000 ortopédicos, 40.000 neuroquirúrgicos y 130.000 implantes mamarios. Entre estos tipos de implantes, los que presentan una mayor tasa de infección son los implantes cardiovasculares de dispositivos de asistencia ventricular con una tasa de 40%. Los implantes de otro tipo tienen, en este país, una tasa de infección menor al 10%. El costo medio estimado del tratamiento médico de cada una de estas infecciones es de aproximadamente US \$ 30.000 [4].

En este contexto, existe una alta demanda por nuevas sustancias capaces de reducir las infecciones producidas por bacterias, implantes contaminados o intoxicación por comida en mal estado [5]. A estas sustancias se les llama agentes antimicrobianos. El

problema radica en que estos agentes tienen una alta toxicidad para el medio y, generalmente, sus habilidades biocidas son limitadas al no tener control sobre la tasa de liberación de iones. Para evitar este problema los materiales biocidas pueden ser agregados a matrices poliméricas.

I.1.3 Metales antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos son sustancias que matan o inhiben el crecimiento de microorganismos tales como bacterias, hongos, parásitos o virus. Estos pueden ser orgánicos o inorgánicos. Dentro de los agentes antimicrobianos orgánicos se encuentran, por ejemplo, el triclosán, la clorhexidina, la tetraciclina y sus derivados tales como clorotetraciclina y doxiciclina, etc. Entre los biocidas inorgánicos tenemos la inserción de óxidos como dióxido de titanio (TiO_2), óxido de zinc (ZnO), dióxido de cloro (ClO_2) y óxido nítrico (NO). Otro tipo de agente antimicrobiano inorgánico son los metales tales como el cobre y la plata. Existen, en la literatura, diversos estudios que trabajan con plata como agente biocida, sin embargo, el cobre puede ser una mejor alternativa ya que es mucho más barato que la plata y es menos tóxico para el ser humano [6].

I.2 Cobre como Biocida

I.2.1 El cobre metálico: Propiedades y aplicaciones

El cobre es un metal de transición que tiene diversas propiedades y aplicaciones. Entre las propiedades del cobre se encuentra que es un excelente conductor eléctrico y térmico, altamente dúctil, tenaz y fácilmente reciclable. Es un material resistente a la corrosión, maleable y en aleación con otros metales, puede adquirir características tales como dureza, resistencia a la tracción y una mayor resistencia a la corrosión. La versatilidad de este metal lo hace uno de los recursos naturales más útiles del mundo [7].

Dadas sus diversas propiedades el cobre tiene aplicaciones en la electricidad y productos electrónicos, en la construcción de edificios, equipamiento de transporte, productos de consumo general y maquinaria industrial y equipamiento como se muestra en la Figura 1 [8].

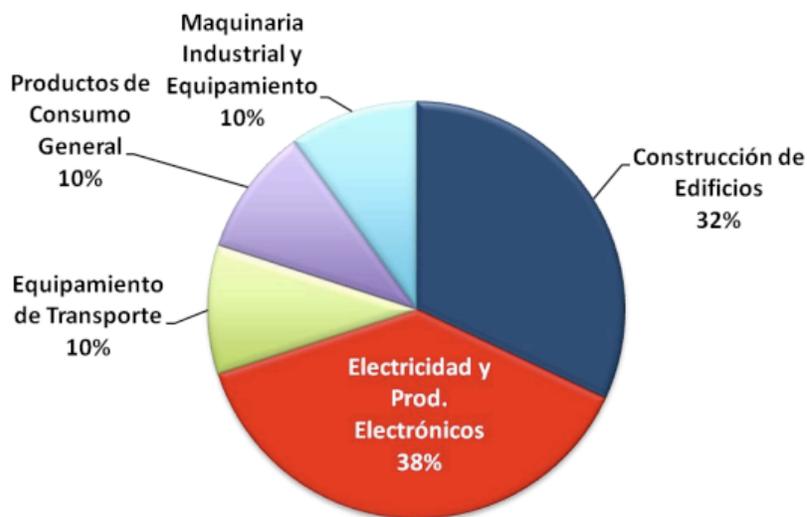


Figura 1. Principales usos del cobre a nivel mundial.

El cobre es un elemento esencial para el organismo y, por esta razón, está contenido en ciertos alimentos (mariscos, hongos, semillas, legumbres, etc.) y en el agua. El cobre es un micro-nutriente requerido por el organismo para tener buena salud. Su carencia puede provocar anemia, baja de glóbulos blancos y plaquetas, osteoporosis y fragilidad del hueso, infecciones pulmonares severas, alteraciones del ritmo cardíaco, aumento de la presión arterial, malformaciones o menor crecimiento del feto, entre otras [9].

Actualmente existe mucho interés por las aplicaciones del cobre en la medicina. Para esto hay que conocer cuál es la cantidad ideal de cobre en el ser humano o cuanto cobre es efectivamente bueno para el organismo. La Tabla 1 muestra la dosis recomendada y máxima diaria por grupo etario [9].

Tabla 1. Dosis recomendada y límite máximo de cobre por día.

Grupo	Recomendación [mg/día]	Límite máximo [mg/día]
1 - 3 años	0,34	1
4 - 8 años	0,44	3
9 – 13 años	0,70	5
14 – 18 años	0,89	8
Mayor de 18 años	0,90	10
Embarazada	1,00	8 - 10
Nodriza	1,30	8 - 10

Si no se respetan estos parámetros mencionados se puede estar en una situación de carencia o exceso de cobre lo que es, en ambos casos, muy perjudicial para la salud. La Figura 2 muestra la relación entre la dosis de cobre y sus efectos en el organismo de las personas [9].

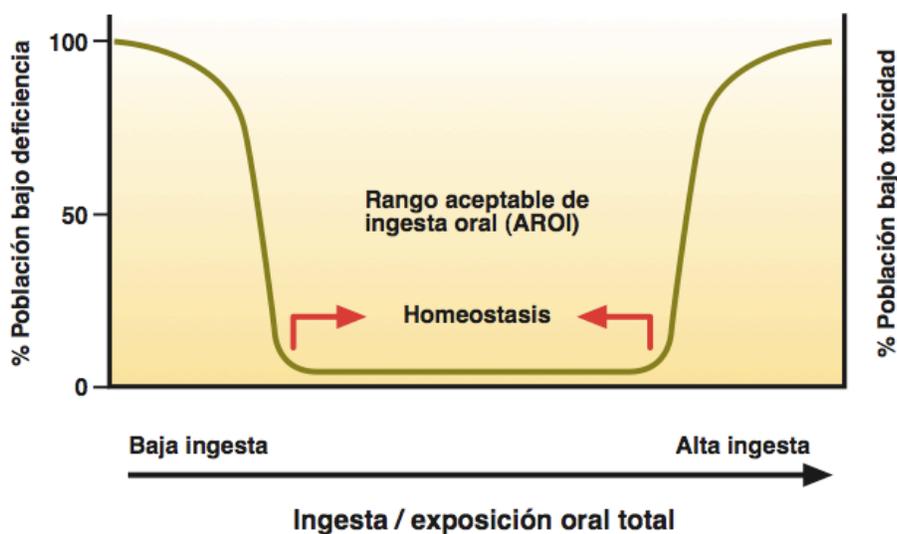


Figura 2. Relación dosis de cobre y sus efectos.

Si bien esta curva representa sólo la ingesta de cobre, se puede observar que, a bajas concentraciones de cobre en el organismo la mayoría de las personas se ve afectada por su carencia. En la situación teórica de una alta ingesta de cobre, la mayor parte de la población sufriría una intoxicación.

1.2.2 Mercado del Cobre

El cobre es la mayor riqueza natural mineral de Chile y las mayores reservas mundiales de cobre se encuentran en nuestro país. La sustentabilidad del mercado del cobre es muy importante en las aspiraciones de desarrollo de Chile, sin embargo, se destinan escasos recursos actualmente hacia la búsqueda de nuevas aplicaciones para este metal [11].

Chile es el mayor productor y exportador de cobre a nivel mundial, con una producción, en el año 2011, de 5,26 millones de toneladas métricas (TM) lo que se puede ver en la Figura 3. Sin embargo se puede observar un estancamiento en la tasa de crecimiento de la producción en los últimos años, a partir del año 2004 [8].

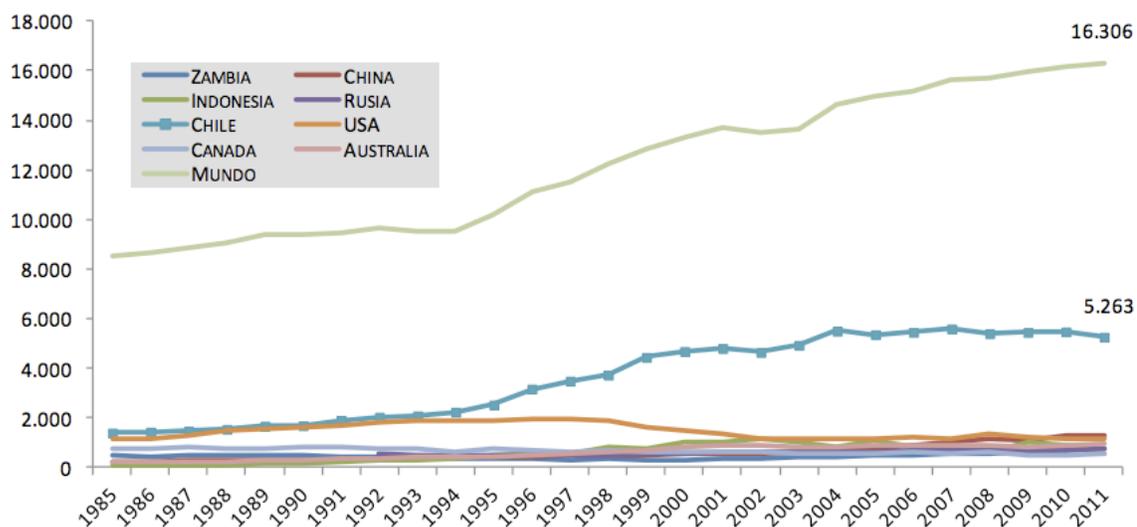


Figura 3. Evolución mundial de la producción de cobre durante el período 1985-2011 (millones de TM).

El cobre es muy demandado sobre todo por países como China cuya demanda ha aumentado considerablemente, a una razón de 9,4% por año, en los últimos años llegando, en el año 2011, a 7,92 millones de TM lo que corresponde a 39,8% del consumo mundial de cobre. La evolución de la demanda de los principales países que consumen cobre refinado se muestra en la Figura 4 [8].

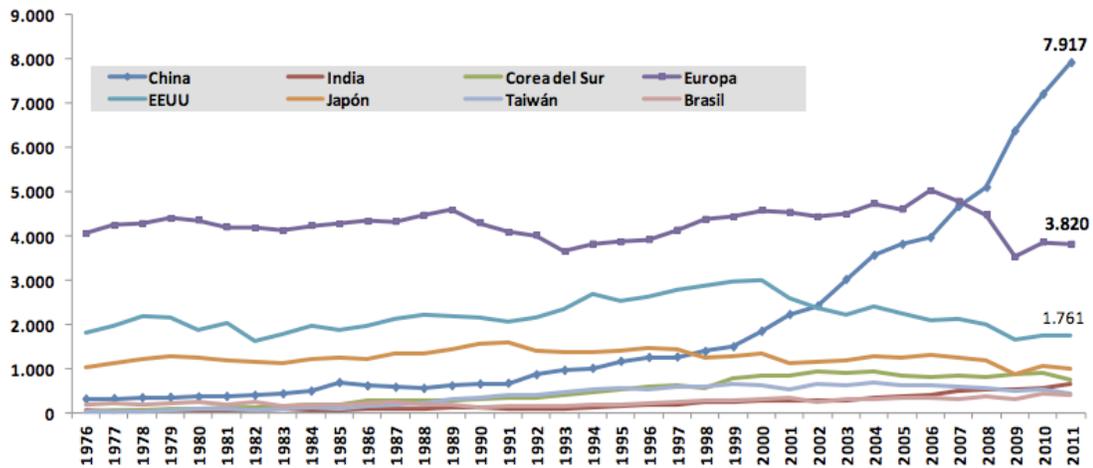


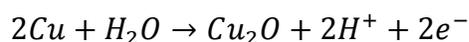
Figura 4. Evolución de principales países demandantes de cobre en el periodo 1976-2011 (millones de TM).

1.2.3 El cobre como bactericida

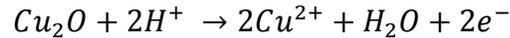
Por sus propiedades antibacterianas, el cobre se ha transformado en el agente biocida más utilizado en los últimos años y se puede ver actualmente en aplicaciones tales como artículos médicos, recubrimientos de pasamanos en transporte público y revestimientos intrahospitalarios [9]. El cobre como agente bactericida ha sido estudiado últimamente, debido a la habilidad de este metal de aceptar o donar fácilmente sus electrones, esta propiedad permite al cobre alterar las proteínas dentro de las células e inhibir el transporte electrónico en las interacciones de la pared celular [10].

Específicamente, en presencia de agua y oxígeno, el cobre libera iones positivos de cobre y genera radicales hidroxilo, ambos altamente tóxicos. Además, los electrones producidos por las reacciones de oxidación interactúan con las moléculas de agua produciendo otros radicales hidroxilos. Este proceso se muestra en las siguientes reacciones [11].

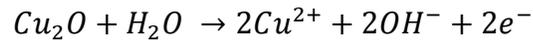
Reacción de oxidación del cobre en presencia de agua:



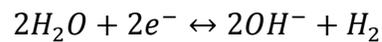
Reacción de oxidación del cobre de Cu^+ a Cu^{2+} en presencia de protones hidrógeno:



Reacción de oxidación de cobre de Cu^+ a Cu^{2+} en presencia de agua:



Reacción de formación de radicales hidroxilo en presencia de agua:



Existen diversos mecanismos que explican el efecto tóxico que tienen tanto los iones cúpricos como los radicales hidroxilo sobre los microorganismos. Estos mecanismos, que se pueden observar en la Figura 5, se explican a continuación [11, 12]:

- Los iones cúpricos se unen a los lípidos y a las proteínas de la membrana celular de las bacterias robando electrones a estas moléculas y, en definitiva, cambian la composición de la membrana. Este cambio crea un desbalance en la entrada y salida de minerales esenciales (sodio, potasio) para el normal funcionamiento de los microorganismos. El metal ingresa por los tramos alterados de la membrana de las bacterias y se fija en los sitios de unión que le confieren su actividad biológica desplazando a los metales que, originalmente, formaban parte de esta estructura. Esto último altera la síntesis de proteínas.
- Los radicales hidroxilo, formados a partir de la interacción de los electrones producidos en las reacciones de oxidación con el agua, impiden el correcto funcionamiento de las proteínas dentro de las células coartando el transporte electrónico.
- Finalmente, los iones cúpricos al unirse a los ácidos nucleicos provocan desordenes de la estructura helicoidal del ADN, rotura de la cadena de ADN y mutaciones genéticas.

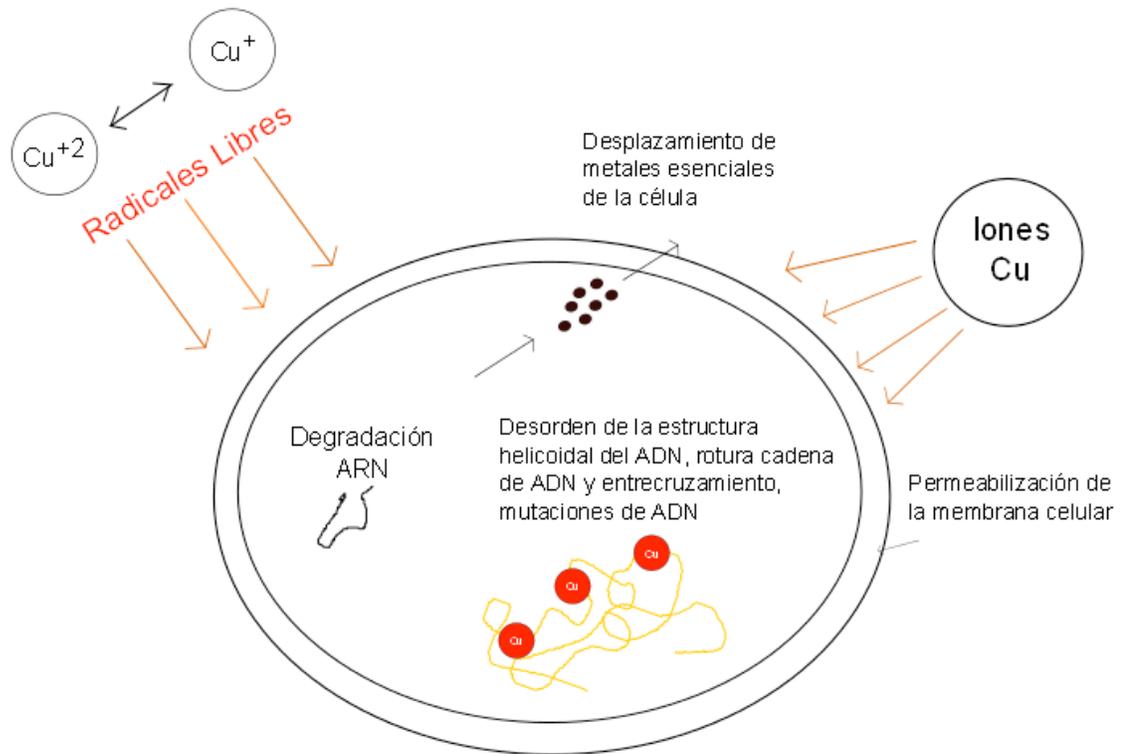


Figura 5. Mecanismo de inactivación de una bacteria con cobre.

El cobre, en altas concentraciones, es totalmente perjudicial para las bacterias (tales como la *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* e Influenza A, entre otras) [10].

1.2.4 Nanotecnología y Nanopartículas de Cobre

La nanotecnología es la ciencia involucrada en el diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales y dispositivos cuya estructura funcional más pequeña tenga al menos una de sus dimensiones a nano escala, es decir menos de 100 [nm] [13].

En los últimos años, la nanotecnología ha evolucionado considerablemente generando importantes avances en áreas tan diversas como la medicina, las comunicaciones, la genómica y la robótica. Las aplicaciones más importantes de la nanotecnología en la

medicina, en los últimos años, han sido en la industria farmacéutica en el ámbito de la administración de fármacos [13].

En el contexto de los estudios del cobre como biocida surge el interés por las nanopartículas de cobre. Las nanopartículas de cobre, como todo compuesto nano, tienen una gran área superficial con respecto a su volumen lo que hace resaltar las propiedades del cobre y favorece la liberación de iones cobre siendo aún más tóxico para los microorganismos patógenos. Este efecto se puede observar en la Figura 6 que muestra un gráfico de la velocidad de corrosión del cobre en agua destilada para micropartículas y nanopartículas de cobre [14].

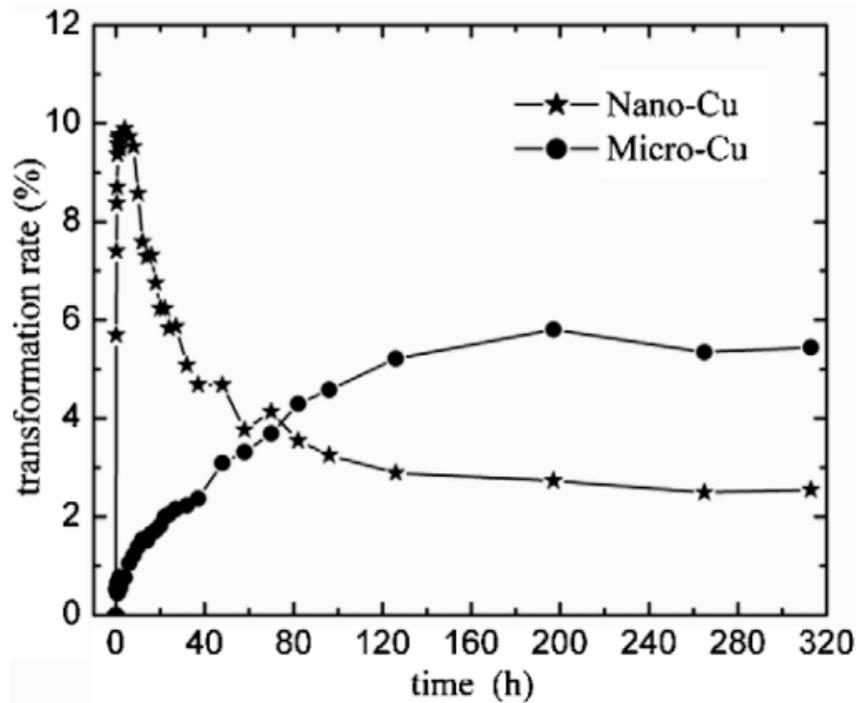


Figura 6. Comparación de la velocidad de liberación de iones cobre para micropartículas y nanopartículas [14].

I.3 Compósitos Poliméricos

Un compósito, en primer lugar, es un material constituido por más de un componente. Cuando se habla de compósitos poliméricos es porque uno de estos componentes es un polímero.

Los polímeros, y particularmente las poliolefinas, son de fácil procesamiento y bajo costo por lo que es muy conveniente su utilización como matriz de estos compósitos [15]. A esta matriz polimérica se le incorpora un relleno durante el procesamiento del material. El relleno, que puede ser de naturaleza orgánica o inorgánica, transfiere sus propiedades a la matriz polimérica obteniendo nuevos materiales, por ejemplo, polímeros antimicrobianos [6].

Los nanocompósitos poliméricos son compósitos en los cuales el relleno es un compuesto nanométrico.

I.3.1 Nanocompósitos antimicrobianos

Los polímeros antimicrobianos están siendo muy estudiados durante la última década. Existen 4 clasificaciones posibles para este tipo de materiales: (a) los polímeros que exhiben actividad antimicrobiana por sí mismos, (b) aquellos cuya actividad bactericida se confiere mediante una modificación química, (c) los polímeros a los que se les incorporan agentes antimicrobianos orgánicos, y (d) aquellos a los que se les incorporan agentes antimicrobianos inorgánicos siendo estos dos últimos los más interesantes para este trabajo [6].

Estos polímeros con un relleno biocida se preparan a partir de la incorporación de agentes biocidas en la matriz del polímero durante la síntesis del material. La forma más utilizada y más eficiente para la preparación de estos compósitos es la adición directa del agente biocida en la matriz del polímero mediante mezclado por fundido [5].

La propiedad antimicrobiana de estos compósitos ha sido comprobada en diversos estudios. Se ha comprobado una importante acción antimicrobiana de estos compósitos frente a *P. fluorescens*, *B. circulans*, *E. coli* and *S. aureus* [16].

Específicamente, en la Figura 7, se muestra el efecto de la concentración de nanopartículas de cobre en una matriz de polipropileno sobre el tiempo requerido para matar el 50% de *Escherichia coli*. Se observa que la acción biocida del polímero aumenta con la cantidad de cobre [5].

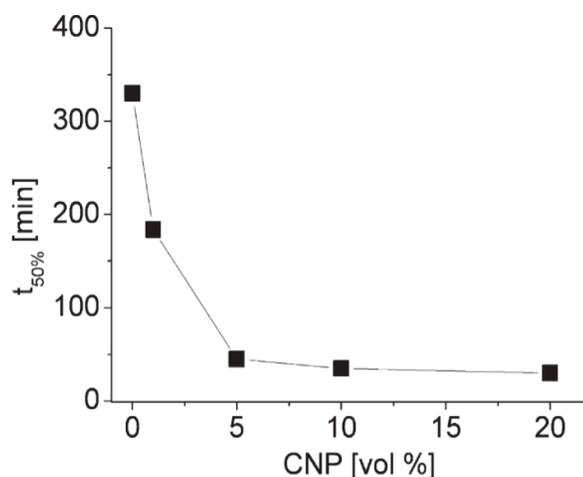


Figura 7. Efecto de la concentración de nanopartículas de cobre en la matriz de polipropileno sobre el tiempo requerido para matar el 50% de *Escherichia coli* [5].

1.3.2 Polipropileno

El polipropileno (PP) es un polímero perteneciente a la familia de las poliolefinas. Es un polímero de gran producción y consumo a nivel mundial por lo que se le denomina commodity. Al igual que el polietileno, polímero perteneciente a la misma familia, el polipropileno es un material muy versátil y tiene una buena relación costo-rendimiento (bajo costo de producción y procesamiento) [15].

El polipropileno, como se observa en la Figura 8, se obtiene de la polimerización de propileno, un subproducto gaseoso de la refinación de petróleo. El propileno es un

hidrocarburo insaturado que contiene solo átomos de carbono y de hidrógeno, cuya fórmula química es C_3H_6 [17].

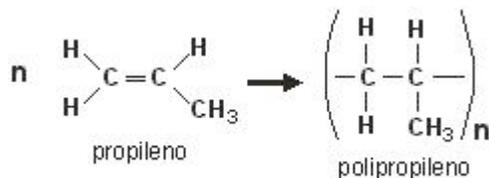


Figura 8. Obtención de Polipropileno [17].

Hay diferentes tipos de polipropileno, como se puede observar en la Figura 9, y estos tienen diferentes propiedades según su tacticidad que depende de la orientación de los grupos metilo con respecto a la cadena polimérica. El polipropileno que generalmente se utiliza es el isotáctico, es decir que tiene todos los grupos metilo del mismo lado de la cadena. También existen, pero son menos comunes, el polipropileno atáctico con sus grupos metilos distribuidos aleatoriamente a ambos lados de la cadena; el sindiotáctico con sus grupos metilos alternados a uno u otro lado de la cadena y el hemisotáctico, es decir, en que los carbonos quirales impares tienen la misma configuración y los pares tienen configuración alternada.

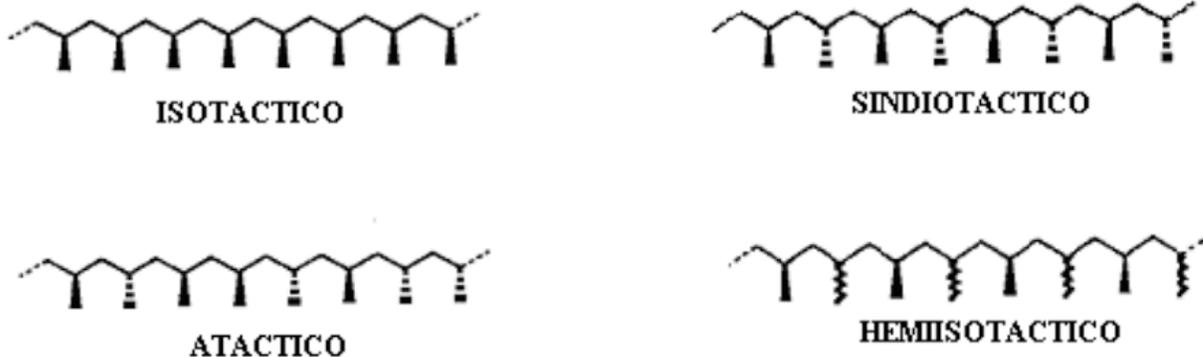


Figura 9. Tipos de polipropileno [17].

Entre las propiedades del polipropileno isotáctico se encuentran las de ser un polímero termoplástico que logra alcanzar un buen balance rigidez/impacto y una excelente

resistencia química a solventes comunes y mecánica. El polipropileno se comporta de manera rígida y frágil a bajas temperaturas.

Las principales propiedades del polipropileno se resumen en la Tabla 2 [16,18].

Tabla 2. Resumen de principales propiedades del polipropileno.

Propiedades	Unidad	Valor
Densidad	g/cm ³	0,9
Calor Especifico	J/g°C	1,926
Conductividad Térmica	W/mK	0,17-0,22
Modulo de Elasticidad	GPa	1-1,7
Resistencia a la Tracción	MPa	25-40

El polipropileno es un polímero muy versátil que tiene múltiples aplicaciones en [17]:

- Industria automotriz: Se utiliza en interiores, exteriores y bajo el capó. El polipropileno es el polímero más utilizado en la industria del automóvil.
- Medicina: El polipropileno se utiliza en dispositivos médicos, sistemas de administración de fármacos, embalaje de dispositivos médicos y drogas, etc.
- Accesorios: Las aplicaciones de polipropileno incluyen conductos para secadoras, tapas para lavadoras de ropa, secador de pelo, revestimientos de refrigeradores, etc.
- Textiles: Las fibras de polipropileno se utilizan en las alfombras, interiores de automóviles y ropa.
- Envases: El polipropileno se utiliza para el embalaje de galletas, papas fritas, dulces, pan, pastas, productos lácteos, alimentos preparados, frutos secos, snacks, jeringas, y los frascos de medicamentos. Se utiliza, también, como envoltura flexible para camisas, medias, juguetes, alimentos congelados y cigarrillos.

1.3.3 Alginato

El alginato es un polímero natural del tipo polisacárido que forma parte de la pared celular de las algas caféas (Phaeophyceae) [19]. Los alginatos son una familia de heteropolímeros lineales compuestos por monómeros de ácido manurónico (M) y su epímero el ácido gulurónico (G). La distribución y contenido de los monómeros es muy variada y el número de monómeros en los bloques es también muy variable. Esta variabilidad en la composición del alginato le confiere la versatilidad en la capacidad de gelificación: un alginato con alto contenido de ácido gulurónico genera geles rígidos, mientras que uno de bajo contenido produce geles suaves y elásticos [19, 20]. Los componentes del alginato se pueden observar en la Figura 10.

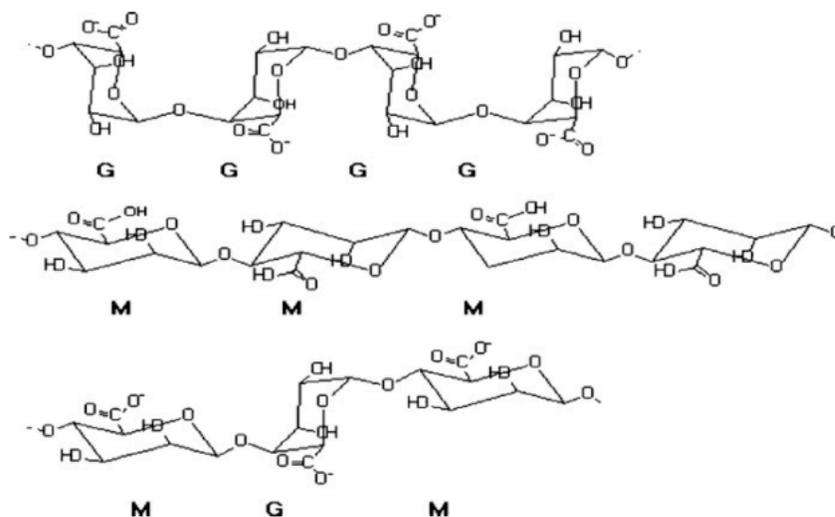


Figura 10. Componentes de los alginatos: Bloques G-G, M-M y G-M.

El alginato puede estar en forma de sal sódica, potásica o magnésica. Es un polímero soluble en soluciones acuosas a pH por encima de 3,5. La viscosidad del alginato depende mucho de su concentración y disminuye al aumentar la velocidad de agitación, es decir, tiene un comportamiento no newtoniano [21].

Para formar hidrogeles de alginato, se entrecruza este polímero con cationes polivalentes como calcio (Ca^{2+}), bario (Ba^{2+}) y aluminio (Al^{3+}). Esto sucede ya que cuando dos cadenas del bloque G se alinean se forman cavidades que tienen el tamaño

adecuado para acomodar un catión polivalente. Los geles formados son mecánicamente estables. [22].

El alginato tiene múltiples aplicaciones en industrias tan variadas tales como alimenticia, farmacéutica y textil, entre otras. En la industria de alimentos tiene aplicaciones como estabilizante y espesante en bebidas, jugos, cervezas, salsas, helados, etc. En la industria farmacéutica se usa como material encapsulante en el cultivo de células y trasplante, como material de impresión dental cumpliendo la función de molde y como vendaje para heridas. Se utiliza también en la industria textil como agente adhesivo y en la pintura como estabilizador y agente de suspensión [19].

I.3.4 Métodos de Fabricación

Existen tres métodos estándar para preparar compósitos poliméricos independiente del relleno que se tenga. Estos son: el mezclado en solución, la polimerización in situ y el método de mezclado por fundido.

Se explicarán con mayor detalle los que se utilizarán, en este estudio, para la fabricación de compósitos poliméricos de polipropileno y alginato con nanopartículas de cobre. Se utilizará el método de mezclado por fundido para preparar el polipropileno y el alginato se preparará en solución acuosa.

I.3.4.1 Mezclado por Fundido

Los compósitos poliméricos de polipropileno se preparan con la técnica de mezclado por fundido. La mezcla se realiza en un equipo de mezclado, el cual calienta el polímero hasta el punto de fundido. Las nanopartículas son incorporadas en el seno del polímero fundido [23].

I.3.4.2 Nanocompósitos en solución

Los compósitos poliméricos de alginato se preparan en solución, en dónde se mezclan el polímero y las nanopartículas. Es necesario poner agitación al sistema, por medio de un agitador magnético, para asegurar la homogenización de la solución [24].

I.4 **Bioreactividad del Cobre**

I.4.1 **Cultivos celulares**

Una célula es la unidad morfológica y funcional de todo ser vivo. Existen dos grandes clasificaciones para las células: las procariotas y las eucariotas. Las células procariotas no tienen un núcleo celular definido, es decir, su material genético se encuentra disperso en el citoplasma. Entre las células procariotas se tienen a las bacterias y los arqueos. Las células eucariotas difieren de las procariotas en muchos aspectos. En primer lugar, son más grandes y tienen un núcleo delimitado por una membrana que contiene el material genético. Además, las células eucariotas contienen diversas estructuras encerradas por membranas, llamadas organelos, que realizan funciones específicas dentro de la célula. Esta célula forma los cuerpos de protistas, plantas, hongos y animales.

En este trabajo se tiene un polímero antimicrobiano que podría tener diversas aplicaciones médicas muy interesantes si su citotoxicidad, es decir su cualidad de ser tóxico a la células, sobre células eucariotas fuera nula o prácticamente nula. Para esto es fundamental el estudio del comportamiento de las células eucariotas, particularmente de animales, en presencia de este compósito. Para este tipo de estudio se realizan cultivos celulares, esto para emular, in vitro, el comportamiento de las células frente a un sustrato extraño. La gran mayoría de las células son adherentes. Esto quiere decir que necesitan adherirse al sustrato para poder crecer, proliferar y realizar sus funciones normalmente [25].

Existen dos tipos de cultivos celulares:

- Primarios
- Secundarios o subcultivos

Un cultivo primario es aquel que se produce por primera vez en la vida de la célula, es decir, son aquellos cultivos en los que la célula es extraída directamente del tejido y aislada por primera vez. Después de este primer cultivo, el cultivo primario se conoce como línea celular y puede ser subcultivado varias veces hasta que se produce senescencia de la célula o muerte celular (Línea celular finita). Hay líneas celulares que sufren una transformación espontánea o manipulada por oncogenes y/o factores mutagénicos y crecen indefinidamente (Línea celular continua) como es el caso de algunas líneas celulares cancerígenas. Lo descrito anteriormente se puede observar en la Figura 11 [25,26].

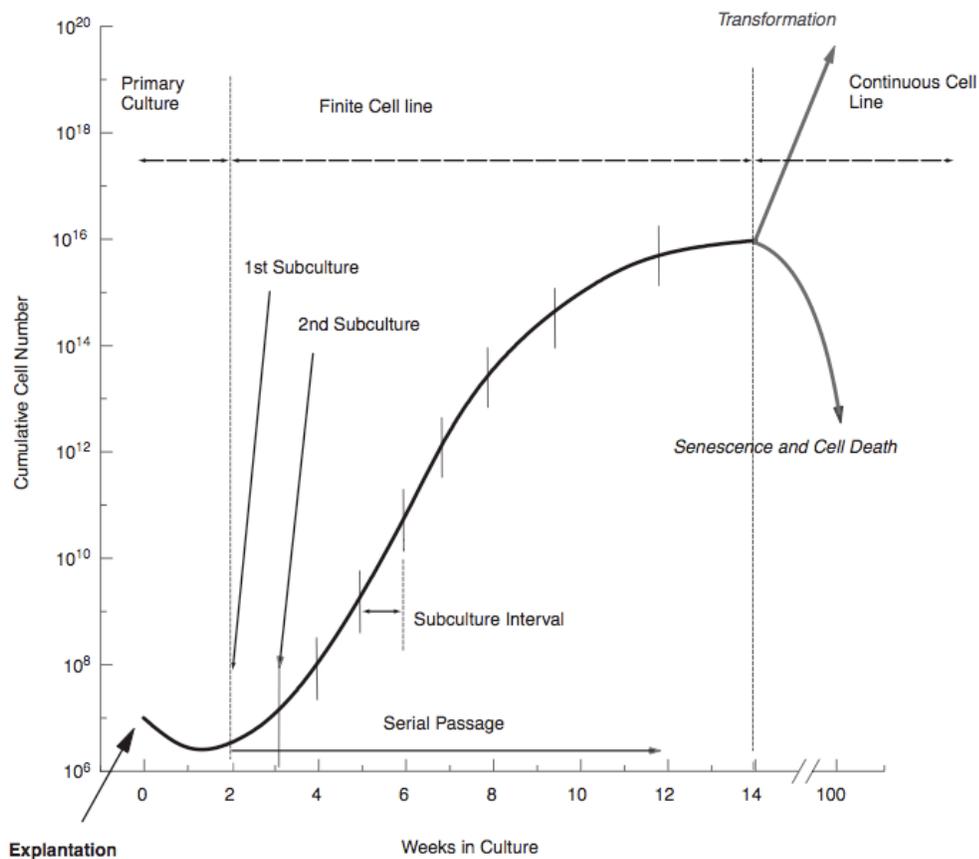


Figura 11. Evolución de una línea celular [25].

I.4.1.1 Líneas celulares

Para este estudio se trabajó con líneas celulares continuas, es decir que sufrieron una transformación espontánea o manipulada por oncogenes y/o factores mutagénicos y crecen indefinidamente pudiendo ser subcultivadas múltiples veces.

Se trabajó con dos líneas celulares:

- CNh: línea celular de corteza cerebral de feto de ratón normal. Es una línea celular muy utilizada para estudios de cultivos en el laboratorio de Terapia Celular ya que está largamente caracterizada y es relativamente fácil de trabajar. Son células adherentes y su tasa de duplicación es de 14 horas.
- UCHT1: Línea celular de tiroides endocrina cancerígena, proveniente de una rata Fisher 344. Se utilizó esta línea para efectos de comparación con las líneas celulares normales.

I.4.2 **Ensayos de Citotoxicidad**

Existen diversos ensayos que se pueden realizar a partir de las líneas celulares animales para evaluar la citotoxicidad del compósito polimérico. Entre estos ensayos de viabilidad celular, se pueden encontrar en la literatura aquellos que actúan sobre la membrana celular (Azul tripan (TB); Calceína AM (CAM); Live/Dead; etc.), sobre la membrana lisosomal (Rojo neutro (NR)), sobre el metabolismo mitocondrial (MTT) o sobre el metabolismo celular en general (alamar Blue (aB), etc.).

Un resumen con el fundamento y modo de acción de cada uno de estos ensayos principales se puede observar en la Tabla 3 [27].

Tabla 3. Resumen de ensayos de viabilidad celular.

Ensayo	Fundamento	Acción
Azul Tripán (TB)	Tiñe con tinte azul las células muertas	Membrana celular
Calceína AM (CAM)	Tiñe con tinte verde fluorescente las células vivas	Membrana celular
Live/Dead (LD)	Tiñe con tinte verde fluorescente las células vivas; Tiñe con tinte rojo fluorescente las células muertas	Células vivas: membrana celular Células muertas: ácido nucleico
Rojo Neutro (NR)	Absorción lisosomal en células vivas	Membrana lisosomal
MTT	Conversión del MTT a su forma insoluble formazan en células vivas	Metabolismo mitocondrial
Alamar Blue (aB)	Reducción de la resazurina a resorufina (rojo fluorescente) en células vivas	Metabolismo celular

Para este trabajo se planteo la adaptación de los métodos MTT y Live/Dead para medir la citotoxicidad de los compósitos poliméricos en estudio. Se escogieron estos métodos en base a su diferencia en su modo de acción, a que son dos métodos generalmente muy utilizados en este tipo de estudios y que podían aplicarse al estudio de a compósitos poliméricos.

1.4.2.1 Ensayo de viabilidad celular MTT

Este ensayo tiene por objetivo determinar el efecto citotóxico del compuesto sobre líneas celulares tumorales o cultivos de células normales. Se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5 difeniltetrazólico (MTT), que tiene una coloración amarilla, a su forma insoluble formazan (compuesto de color púrpura) cuyas estructuras se muestran en la Figura 12. Esta acción es realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de formazan formado es el indicador de viabilidad celular en este ensayo [28].

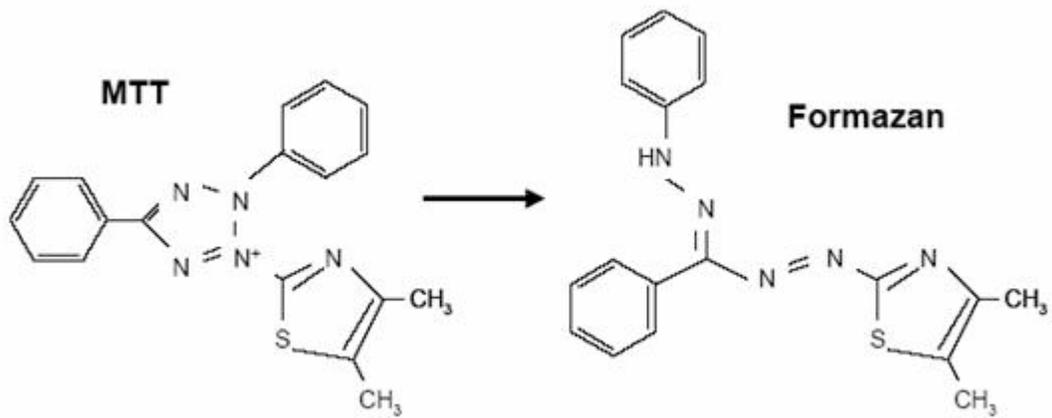


Figura 12. Reducción del MTT a Formazan por la acción de una enzima mitocondrial.

Los Cristales de formazan formados quedan retenidos por la célula. El formazan se disuelve en isopropanol y luego es cuantificado midiendo la absorción en un espectrofotómetro a 540 [nm] [28].

En la Figura 13 le puede observar un diagrama del principio del ensayo MTT.

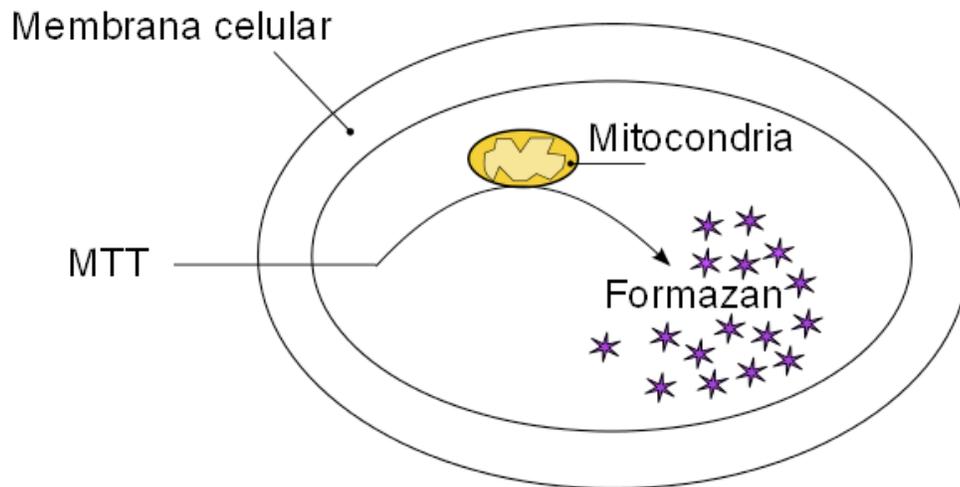


Figura 13. Diagrama principio MTT.

I.4.2.2 Ensayo de viabilidad celular Live/Dead

Este ensayo tiene por objetivo observar la viabilidad celular por microscopio, es decir ver si las células están vivas o muertas, y analizar su morfología.

Este ensayo se basa en agregar al medio de cultivo dos reactivos:

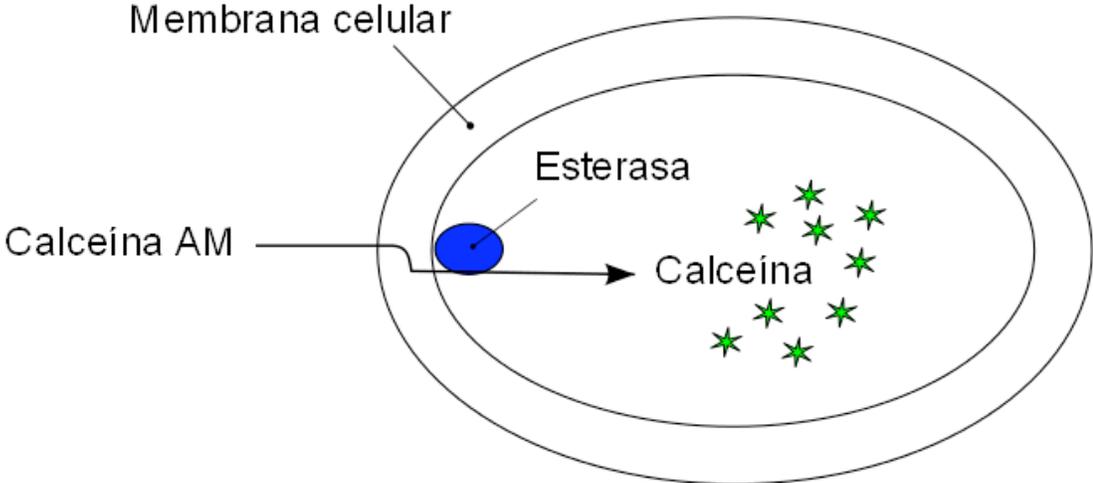
- Calceína AM: penetra en la célula a través de la membrana, donde el grupo AM es clivado por esterasas intracelulares en las células vivas. Esto libera la sal, que es hidrosoluble, y que produce una fluorescencia verde. La fluorescencia verde es, por lo tanto, el marcador vital.
- Ioduro de Propidio (IP): penetra en las células que tienen la membrana dañada y produce una fluorescencia roja al unirse a los ácidos nucleicos. Es, por lo tanto, el marcador de mortalidad celular.

Por lo tanto, la fluorescencia verde indica que las células se encuentran vivas mientras que la roja indica que se encuentran muertas.

Los resultados se observan en el microscopio de fluorescencia. Para esto se sacan los discos poliméricos cuidadosamente de la placa de cultivo y se ponen en unos portaobjetos de tal forma que las células adheridas al polímero queden hacia abajo [29].

En la Figura 14 se puede observar un diagrama del principio del ensayo Live/Dead.

Célula Viva



Célula Muerta

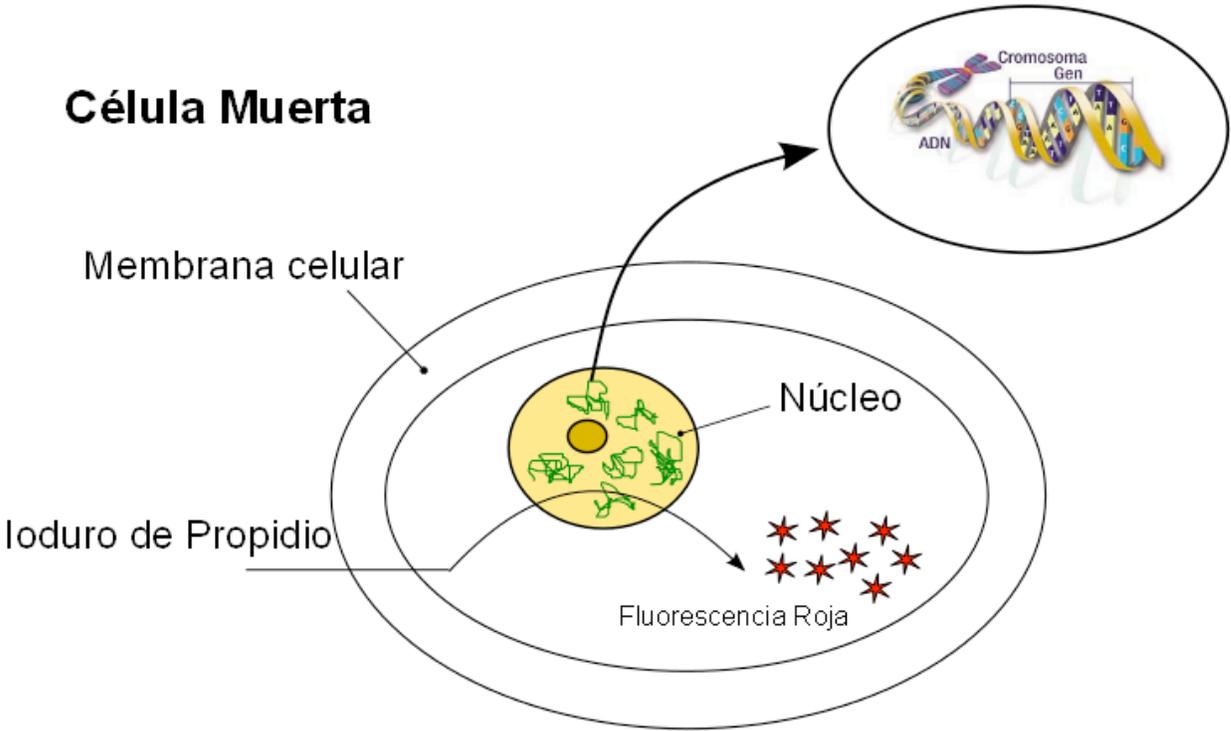


Figura 14. Diagrama principio Live/Dead.

1.4.3 Estudios de Citotoxicidad del cobre

No existen, en la literatura, muchos estudios sobre la citotoxicidad de este tipo de compósitos poliméricos con cobre, he ahí la necesidad de estudiar estas propiedades. Sin embargo se encuentran estudios de la citotoxicidad del cobre. La diferencia entre los compósitos poliméricos con nanopartículas de cobre y el cobre puro radica en el control que se puede tener, en el primero, sobre la lixiviación de iones cobre. Esto por no tratarse de cobre puro sino que estar contenido en una matriz polimérica. Se puede observar que las conclusiones, respecto a la citotoxicidad de este metal, son diversas.

En un estudio se evalúa la toxicidad de unas nanopartículas de hidroxiapatita substituidas con cobre (II) y titanio (IV) en diferentes relaciones molares con respecto a la cantidad de calcio del material (M/Ca), que en el caso del cobre son las siguientes: M/Ca=0,005; 0.01 y 0.05. Los compósitos se sintetizaron por intercambio iónico en solución acuosa y el ensayo se realizó sobre células óseas (osteoblastos). Se utiliza el ensayo MTT y los resultados se pueden observar en la Figura 15 [30].

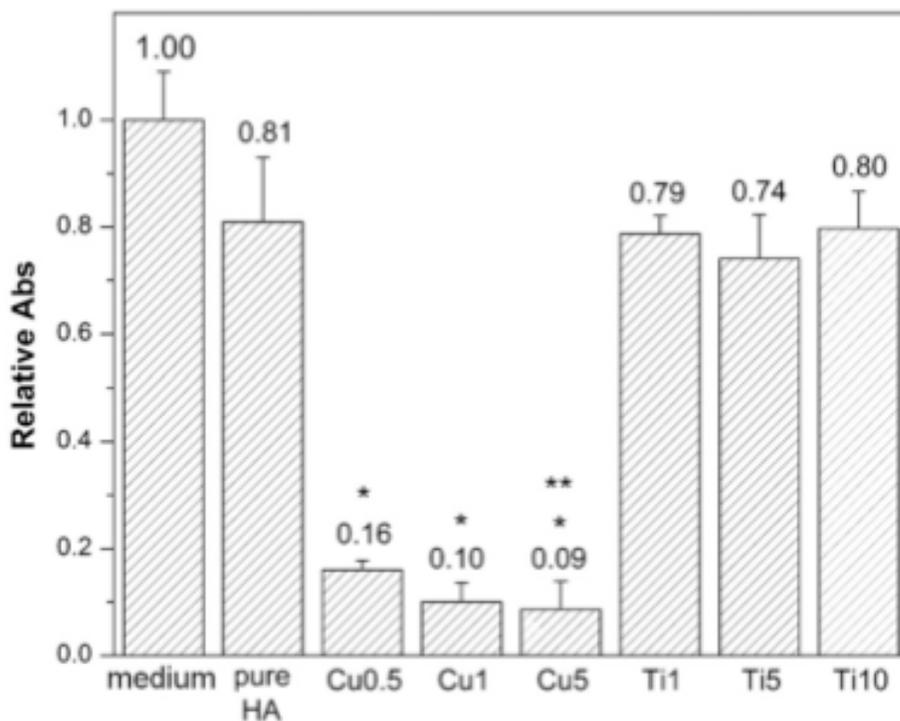


Figura 15. Resultados ensayo MTT en el estudio sobre la citotoxicidad de CuHa sintetizado por intercambio iónico en solución acuosa [30].

En este estudio se observa que el cobre es altamente citotóxico, en estas condiciones, con respecto al titanio para las células óseas. En este caso no recomiendan su uso como revestimiento para implantes.

Otro estudio, que evalúa la citotoxicidad, sobre fibroblastos de ratón, de nanopartículas de cobre solubles en agua en una matriz de polisacárido (ScuNPs), obtiene resultados bastante más alentadores [31]. Se evaluó la citotoxicidad de estas nanopartículas cubiertas (ScuNPs), de nanopartículas no cubiertas (UcuNPs) y la de iones cobre Cu^{2+} , exhibiendo, las primeras, citotoxicidad a concentraciones de cobre en el polímero mucho más altas. En este caso se utilizó nuevamente el ensayo MTT lo que confirma que se trata de una técnica muy utilizada actualmente en estudios de este tipo. Los resultados se muestran en la Figura 16.

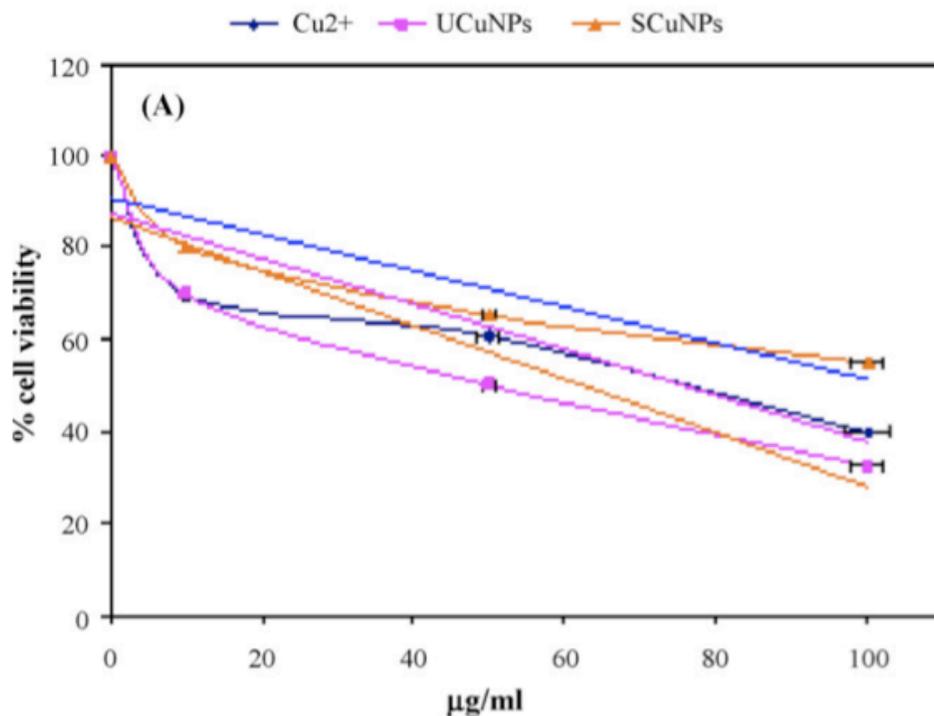


Figura 16. Resultado ensayo MTT en el estudio de de nanopartículas de cobre en una matriz de polisacárido [31].

En este estudio se observa que las nanopartículas de cobre solubles en agua en una matriz de polisacárido (ScuNPs) a una concentración de 100 µg/L tienen un mayor porcentaje de viabilidad celular (aproximadamente 60%) que los iones cobre en las mismas condiciones (menos de 40%). Este estudio demuestra la importancia de incorporar las nanopartículas de cobre en una matriz, polimérica por ejemplo, para controlar la liberación de iones cobre.

Múltiples estudios corroboran otra propiedad muy interesante del cobre y que tiene relación con la biocompatibilidad de este material. El cobre promueve la angiogénesis, es decir el proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los existentes [32]. La angiogénesis es muy importante para la regeneración de tejidos excepto en caso de cáncer ya que los vasos sanguíneos aportan con los nutrientes necesarios para la proliferación de las células cancerígenas. Con esta propiedad el cobre es un elemento muy atractivo en el campo de la ingeniería de tejidos. Esta propiedad del cobre se debe a la capacidad de los iones cobre de estimular la proliferación de las células endoteliales vasculares, es decir las células de endotelio (tejido que recubre el interior de todos los vasos sanguíneos) y puede ser muy interesante para aumentar la vascularización en un implante [33]. En la Figura 17 se puede observar el efecto del cobre (CuSO_4) en la proliferación de células endoteliales humanas, células de músculo liso y fibroblastos.

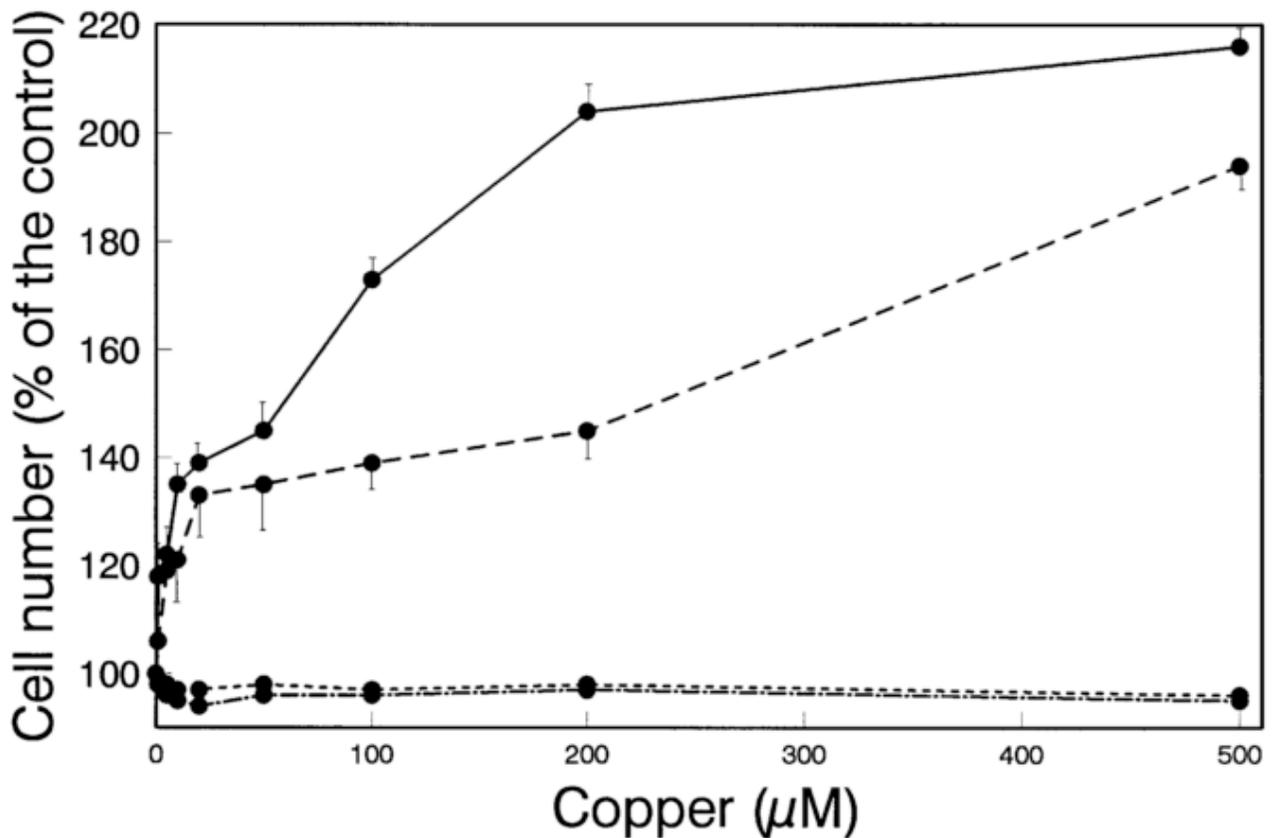


Figura 17. Efecto del cobre sobre la proliferación de células endoteliales (líneas continua y discontinua), células de músculo liso (línea punteada) y fibroblastos (línea encadenada) [33].

En este estudio se observa que el cobre, a concentraciones entre 1-500 μM , no es tóxico para las células evaluadas. Es más, estimula la proliferación de las células endoteliales llegando hasta duplicar el control.

Estudios de compatibilidad celular de estos compósitos poliméricos con nanopartículas de cobre son indispensables para evaluar su aporte en el área médica. Los estudios analizados muestran que el cobre tiene la capacidad de promover la proliferación de ciertas células así como que es muy tóxico en otras condiciones.

I.5 Motivación y Alcances del Trabajo de Título

I.5.1 Motivación

Mediante múltiples estudios previos, se ha demostrado que las propiedades antibacterianas de los polímeros, al ser mezclados con nanopartículas de cobre, mejoran gradualmente. En el laboratorio de Ingeniería de Polímeros de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile se están investigando, particularmente, las propiedades biocidas de una matriz de polipropileno con nanopartículas de cobre.

Al tener propiedades bactericidas, este compósito podría ser utilizado en diversas aplicaciones de la medicina tales como artículos médicos o implantes tanto externos como internos. Sin embargo, no existen estudios sobre la bioreactividad de este tipo de nanocompuestos, es decir, el comportamiento de células humanas y animales en presencia de éste. Para su aplicación en implantes es indispensable este tipo de estudios dentro de los cuales se encuentran los estudios de citotoxicidad.

I.5.2 Alcances

Para este proyecto se estudió la citotoxicidad de los compósitos poliméricos sintetizados. Para ello, se trabajó a escala de laboratorio y con nanopartículas comerciales de 5 [nm] en una matriz polimérica. Se evaluó primero la bioreactividad de una matriz de polipropileno con nanopartículas de cobre para luego evaluar el alginato con nanopartículas de cobre. Se estudió la viabilidad celular de los nanocompuestos realizando pruebas in vitro.

El alcance y objetivo final de éste trabajo es estudiar la citotoxicidad de los compósitos como primer apronte para evaluar su posible aplicación como implantes. Cabe destacar que para propósito de esta memoria de título no se realizarán pruebas in vivo, es decir pruebas con animales. Este tipo de pruebas serán necesarias a futuro si se quiere evaluar rigurosamente la biocompatibilidad de estos compósitos para su aplicación en la medicina, en implantes por ejemplo.

Se trabajará con células animales como una aproximación de lo que podría ser el comportamiento de células humanas en presencia de estos compósitos.

I.5.3 Descripción del Proyecto

En el proyecto de trabajo de título se sintetizarán los compósitos poliméricos con nanopartículas de cobre de 5 [nm] en diferentes porcentajes masa/masa en el Laboratorio de Ingeniería de Polímeros de la Universidad de Chile. Se pretende subcultivar diferentes tipos de células animales sobre las placas de estos compósitos, con el objetivo de evaluar su bioreactividad. Se estudiará la citotoxicidad del nanocompósito, es decir la cualidad del compuesto de ser tóxico a las células.

Se quiere determinar el efecto del cobre, con propiedades antimicrobianas probadas, sobre células animales sabiendo que la tasa de liberación de iones cobre está controlada por el hecho de encontrarse en una matriz polimérica.

Para evaluar la citotoxicidad del compósito se estudiará el porcentaje de viabilidad de las diferentes células en presencia del compósito polimérico.

I.6 Hipótesis de trabajo

Se trabaja bajo la hipótesis que la matriz polimérica no es tóxica, de por sí, para las células. Se espera que, al mezclarla con nanopartículas de cobre, esta matriz continúe siendo inocua para las células demostrando así que no hay toxicidad manifiesta del cobre. Si existe toxicidad esta será despreciable en comparación al efecto bactericida del cobre. Se espera que sea posible cuantificar la citotoxicidad de los compósitos en estudio, es decir determinar la concentración de nanopartículas de cobre que es citotóxica para las células, para así poder, en un futuro, diseñar nuevos materiales biocompatibles y antimicrobianos.

Otra hipótesis para este trabajo es que el comportamiento de las células en presencia de la matriz polimérica no es el mismo para líneas celulares normales y tumorales. Al estudiar el efecto de la matriz en ambos modelos celulares, el compuesto no será tóxico para las líneas celulares normales.

Capítulo II Objetivos

II.1 Objetivo General

Estudiar el efecto de las nanopartículas de cobre sobre la bioreactividad de matrices poliméricas.

II.2 Objetivos Específicos

- 1) Preparar compósitos poliméricos de polipropileno y alginato con nanopartículas de cobre.
- 2) Implementar metodologías que permitan evaluar la citotoxicidad de estos compósitos y estudiar la citotoxicidad de estos.
- 3) Comparar el efecto de la concentración de nanopartículas de cobre de estos compósitos en líneas celulares normales y tumorales.

Capítulo III Parte Experimental

Para el desarrollo del proyecto de trabajo de título se trabajó en el laboratorio de Ingeniería de Polímeros ubicado en el zócalo del edificio de física de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile y en el laboratorio de Terapia Celular ubicado en el tercer piso del pabellón C de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Para lograr los objetivos planteados se siguieron las siguientes etapas:

- Lavado de las nanopartículas de cobre
- Preparación de los nanocompuestos poliméricos
- Preparación de las placas y reactivos de cultivo
- Preparación de los cultivos celulares
- Realización de los subcultivos para los estudios de citotoxicidad
- Realización de los ensayos de viabilidad celular: MTT y Live/Dead
- Realización de ensayos de liberación de iones cobre

Estas etapas nombradas se desarrollarán en esta sección.

III.1 Lavado de Nanopartículas de cobre

Se utilizaron nanopartículas de cobre comerciales de 5 [nm] almacenadas en glicerina adquiridas en la empresa Versus Productos Industriales S.A. Para su lavado se utilizó alcohol metílico al 95% provisto por el laboratorio Equilab. Para el procedimiento se utilizó un agitador magnético ARE y una centrifuga de Hanil.

El procedimiento de preparación de las nanopartículas de cobre se resume a continuación:

- Se mezcla la cantidad deseada de nanopartículas de cobre en glicerina con aproximadamente 300 [ml] de metanol en un vaso precipitado y se agita por 5-10 minutos con un agitador.

- Se deja decantar por 20-30 minutos aproximadamente y se saca el sobrenadante de glicerina con metanol.
- Para obtener mejores resultados de separación de las nanopartículas de cobre, se utiliza una centrifuga. Se centrifuga a 9000 [rpm] por 10 minutos.
- Se repite la centrifugación si se desean obtener nanopartículas más limpias.
- Se deja secando a temperatura ambiente durante toda la noche.

Con las nanopartículas puras secas y almacenadas, se realizaron todas las mezclas de nanocompuestos poliméricos que requerían nanopartículas comerciales.

III.2 Preparación de Nanocompuestos Poliméricos

Las nanocompuestos poliméricos se desarrollan al incorporar las nanopartículas de cobre en la matriz polimérica. Se utilizaron dos tipos de polímeros: Polipropileno y Alginato.

III.2.1 Polipropileno

III.2.1.1 Reactivos y Equipos

Para la preparación de los nanocompuestos poliméricos se utilizó polipropileno PH0320 adquirido en PETROQUIM S.A. La densidad de este polipropileno se encuentra en el rango de $0,905 \pm 0,005 \text{ g/cm}^3$. Las características de este polímero se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Características de Polipropileno PH0320.

Propiedades	Unidad	Valor
Índice de fluidez 2,16 kg/ 230 °C	g/10 min	3,3
Temperatura de ablandamiento VICAT (1 kg)	°C	156
Temperatura de deformación térmica (455 kPa)	°C	94
Resistencia al impacto IZOD a 23 °C	J/m	55
Resistencia a la tracción	Mpa	35
Módulo de elasticidad en flexión	Mpa	1600

Para este estudio, se trabajó con un masterbatch o mezcla previa entre polybond y nanopartículas de cobre.

El polybond es un polímero comercial que corresponde a un homopolímero del polipropileno modificado con anhídrido maleico. Su estructura química se muestra en la siguiente figura.

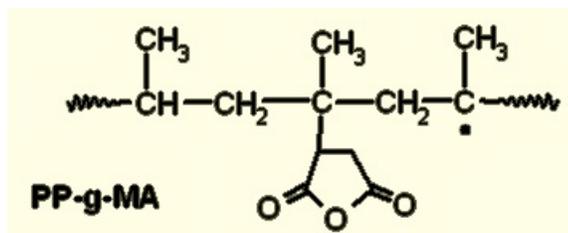


Figura 18. Estructura química del Polybond.

Este polímero actúa como compatibilizante permitiendo la mejor dispersión de las nanopartículas de cobre. Se trabajó específicamente con el Polybond 3200 cuyas propiedades se pueden observar en la siguiente tabla [34]:

Tabla 5. Propiedades del Polybond 3200.

Propiedades	Unidad	Valor
Índice de Fluidez	[gr/10 min]	115
Densidad a 23 °C	[g/cm ³]	0,91
Punto de Fusión	[°C]	157
Nivel de Anhídrido Maleico	[% p/p]	1

Este masterbatch se mezcla posteriormente en diferentes concentraciones con el polímero PH0320 puro.

Para todas las mezclas se utilizó un antioxidante para evitar la degradación del polímero por la temperatura.

Los nanocompósitos poliméricos se prepararon en el laboratorio de Ingeniería de Polímeros. La mezcla se realiza en un equipo de mezclado por fundido batch de marca BRABENDER Plasticorder y luego el prensado en una prensa hidráulica de 8 toneladas para obtener placas de 1 [mm] de espesor.

III.2.1.2 Procedimiento

Las mezclas de polipropileno se realizaron en un equipo por fundido batch a una temperatura de 190 [°C] y una velocidad de rotación de 110 [rpm] durante 10 minutos.

El procedimiento de mezcla se resume a continuación:

- Se preparan los materiales: Se pesan los materiales a utilizar en una balanza. Se agrega una pequeña cantidad de antioxidantes Irganox 1010 al polímero para impedir la degradación temprana de la muestra.
- Se enciende el equipo y se ingresan las condiciones de operación (Condiciones estándar: 110 [rpm], 190 [°C], 10 [min]). Se debe esperar a que el equipo alcance la temperatura deseada.
- Se agregan los materiales preparados. Al finalizar el tiempo de mezcla, se debe extraer polímero caliente lo más rápido posible del equipo y se debe prensar el nanocompósito en la prensa fría de modo de obtener una placa gruesa.
- Se limpia el equipo con espátulas de bronce, escobillas y el limpiador "Rena Lite". Se recomienda realizar este procedimiento mientras el equipo esté caliente. Se debe dejar enfriar el equipo y una vez frío se limpia con etanol.
- Se corta la muestra en pequeños trozos y se prensa a 190 [°C].

Se desarrollaron tres compósitos de polipropileno: polipropileno blanco, polipropileno con 10% y con 20% de nanopartículas de cobre y dos de polybond: polybond puro y el masterbatch de polybond con 50% de nanopartículas de cobre. Es importante especificar que el polipropileno no se mezcla directamente con las nanopartículas de cobre sino que con el masterbatch de polybond con NPCu para una mejor dispersión de estas últimas. Además la muestra de polipropileno blanco corresponde a una mezcla de

polipropileno con 20% de polybond puro para que sea un control representativo para las muestras de polipropileno con NPCu.

Para aumentar la adherencia celular de los polímeros de polipropileno y polybond, se prepararon de dos formas distintas: funcionalizado y con gelatina.

Las placas de polipropileno y polybond se perforan para generar discos que cubran la superficie de los pocillos de la placa de cultivo.

III.2.1.3 Polímero Funcionalizado

El polímero se funcionaliza por plasma utilizando un equipo Plasma Cleaner PDC-32G. El objetivo de esto es modificar la superficie del polímero haciéndolo menos hidrofóbico y de tal forma más polar.

El procedimiento de funcionalización se detalla a continuación:

- Se limpia la superficie del polímero a funcionalizar con etanol.
- Se introduce el polímero dentro de la cámara del equipo asegurándose que la superficie de este no esté mojada. Se cierra la cámara del equipo
- Se abre la válvula de vacío y se enciende el equipo. La operación tiene una duración de 1 minuto.
- Se apaga el equipo y el vacío y se retira el polímero funcionalizado.

III.2.1.4 Polímero con gelatina

El objetivo de esto es agregarle carga a la superficie del polímero.

El procedimiento de preparación se enlista a continuación:

- Se diluye gelatina en agua destilada de tal forma de obtener una concentración del 0,5%. (Por ejemplo para la preparación de 50 [ml] de sustancia, se diluyen 0,25 [g] de gelatina en polvo).

- Se sumerge el disco de polímero que se va a estudiar en gelatina preparada y se deja durante una hora.
- Se aspira la gelatina y se dejan secar los discos que quedan listos para ser utilizados.

III.2.2 **Alginato**

III.2.2.1 Materiales y Equipos

Para la preparación de compósitos de alginato se necesitan vasos precipitados, placas petri de 9 cm de diámetro y goteros para la formación de hidrogeles esféricos.

Además se requiere de cloruro de bario, agua destilada, alginato en polvo y nanopartículas de cobre.

Los nanocompósitos poliméricos de alginato se prepararon en el laboratorio de Ingeniería de Polímeros. La mezcla se realiza en un equipo de agitación magnética marca ARE.

III.2.2.2 Solución de Alginato con Nanopartículas de Cobre

Para trabajar con este polímero se debe preparar una solución de alginato. Hay que incorporar en esta solución las nanopartículas de cobre para lograr sintetizar el compósito.

El procedimiento de preparación de la solución de alginato se muestra a continuación:

- Se mezclan las nanopartículas de cobre, según la concentración deseada, con agua destilada bajo agitación magnética por aproximadamente 10 minutos. Se busca obtener una solución lo más homogénea posible.
- Sin detener la agitación, se agrega el alginato en pequeñas cantidades para no saturar la solución.

Para todos los compósitos de alginato desarrollados se utilizó una solución de alginato al 2%. La cantidad de nanopartículas de cobre que se agrega se calcula en relación a la cantidad de alginato que se disuelve.

Por ejemplo, para una solución de alginato al 2%, y 10% de nanopartículas de cobre con respecto al alginato se agregan en 50 [ml] de agua destilada, 1 [g] de alginato y 0,1 [g] de NPCu.

III.2.2.3 Hidrogeles de Alginato

Como se explicó anteriormente, el alginato forma hidrogeles al entrecruzarse con cationes polivalentes como el Ba^{2+} .

El procedimiento de preparación de estos geles se enlista a continuación:

- Se prepara una solución de Cloruro de Bario al 20 [mM] (Por ejemplo para preparar 50 ml de solución, se requieren 0,21 [g] de Cloruro de Bario (PM = 208,23 [g/mol])).
- Agregar gotas de la solución de alginato con nanopartículas de cobre a la solución de cloruro de bario. Se obtienen hidrogeles de alginato esféricos como los que se muestran en la Figura 19.



Figura 19. Hidrogeles de alginato esféricos (Diámetro de la esfera: 6 mm aproximadamente).

Se desarrollaron seis compósitos de alginato: alginato puro y con 1%, 3%, 5%, 8% y 10% de nanopartículas de cobre.

Los hidrogeles esféricos de alginato obtenidos son estables en la solución de cloruro de bario. La estabilidad en agua de estos compósitos tiene relación con el tiempo que se dejaron en la solución de cloruro de bario y con el tiempo de secado a temperatura ambiente. Los compósitos se tienden a endurecer cuando se dejan secar a temperatura ambiente.

III.2.2.4 Films de Alginato

Los films de alginato que se realizaron también son en base a geles.

El procedimiento de preparación de estos films se enlista a continuación:

- En una placa petri agregar una película delgada de la solución de BaCl de tal forma que cubra la superficie de la placa.
- Agregar una película delgada de la solución de alginato.
- Secar en una estufa a 30 °C por 24 horas.

No se estudió la citotoxicidad de estos films en este trabajo ya que no se pudo obtener un grosor significativo del film. Además tienen la propiedad de ser muy solubles en agua por lo que no se pudo trabajar con estos ya que se disolverían en el medio de cultivo. Se deja, sin embargo, la metodología para futuros estudios.

III.3 Preparación de las placas de cultivo con las muestras de nanocompósitos poliméricos

III.3.1 Materiales y Equipos

Para la preparación de las placas de cultivo se necesitan placas de 96 pocillos así como vaselina sólida estéril y pinzas.

Se requiere de un autoclave para esterilizar las muestras poliméricas y de las muestras poliméricas de polipropileno y alginato

III.3.2 Procedimiento

El procedimiento difiere un poco para los ensayos con compósitos de polipropileno y para los ensayos con compósitos de alginato.

Los procedimientos se muestran a continuación.

Polipropileno:

Los ensayos de citotoxicidad del polipropileno se realizan usando discos de polipropileno de 19,6 [mm²] de área y 1 [mm] de espesor. Los discos de polipropileno se autoclavan para esterilizarlos y luego se pegan con vaselina sólida estéril a partir de la cuarta columna de la placa de 96 pocillos (una columna por muestra, es decir 8 repeticiones) esto ya que las primeras columnas se utilizan para preparar los controles. La vaselina sólida se utiliza para que los discos poliméricos no floten en el medio de cultivo.

Alginato:

Los ensayos de citotoxicidad del alginato se realizan usando hidrogeles esféricos de alginato de 6 [mm] de diámetro aproximadamente. Las esferas de alginato se esterilizan por medio de radiación ultravioleta y luego se depositan a partir de la cuarta columna de la placa de 96 pocillos (una columna por muestra, es decir 8 repeticiones) esto ya que las primeras columnas se utilizan para preparar los controles.

III.4 Preparación de Reactivos principales para los Cultivos Celulares

En esta sección se describe el procedimiento de preparación de medio de cultivo, solución D y tripsina, reactivos esenciales para ambos métodos de viabilidad celular.

III.4.1 Medio de Cultivo

El medio de cultivo es un material alimenticio que se usa en el laboratorio para el desarrollo de los microorganismos. Este cuenta con los nutrientes necesarios para

permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, células, bacterias, tejidos vegetales, etc. según corresponda.

III.4.1.1 Medio de cultivo sin suero

La composición del medio de cultivo utilizado se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Composición del Medio de Cultivo sin suero.

Compuesto	Concentración	Cantidad
DMEM/F12		12 [g]
Bicarbonato (CO₃)	1 [g/lit]	1 [g]
Gentamicina	40 [mg/lit]	40 [mg]
Volumen Total		1 [lit]

El procedimiento de preparación se enlista a continuación:

- Se agregan 12 [g] de DMEM/F12, 1 [g] de Bicarbonato y 40 [mg] de Gentamicina.
- Se afora con agua UltraPura hasta los 1000 [ml] para preparar un litro de reactivo.
- Se ajusta el pH a 7,4.
- Se filtra por una membrana con un tamaño de poro de 0,2 [μ m].

III.4.1.2 Medio de cultivo con suero

La composición del medio de cultivo con suero se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Composición del Medio de Cultivo con suero.

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

El procedimiento de preparación se enlista a continuación:

- Se agregan 5 [ml] de suero bovino fetal, 20 [ml] de suero bovino adulto y 200 [μ l] de ketoconazol.
- Se afora con medio de cultivo sin suero hasta los 200 [ml].
- Se filtra por una membrana con un tamaño de poro de 0,2 [μ m]

III.4.2 Solución D

La solución D es una solución compuesta de sales que se utiliza para lavar los cultivos celulares eliminando así las células muertas del cultivo.

La composición de la solución D utilizada se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. 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 (Na₂HPO₄)	0,17 [mM]	0,024 [g]
Fosfato Monopotásico (KH₂PO₄)	0,22 [mM]	0,029 [g]
Glucosa	5,5 [mM]	1,08 [g]
Sacarosa	5,9 [mM]	2 [g]
Volumen Total		1 [lt]

El procedimiento de preparación se enlista a continuación:

- Se agregan 8 [g] de *NaCl*, 0,4 [g] de *KCl*, 0,024 [g] de *Na₂HPO₄*, 0,029 [g] de *KH₂PO₄*, 1,08 [g] de glucosa y 2 [g] de sacarosa a 5,9 [mM].
- Se afora con agua UltraPura hasta los 1000 [ml] para preparar un litro de reactivo.
- Se ajusta el pH a 7,4.
- Se filtra por una membrana con un tamaño de poro de 0,2 [μ m].

Antes de utilizar, se vuelven a filtrar 250 [ml] de la solución por una membrana con un tamaño de poro de 0,2 [μm].

III.4.3 Tripsina

La tripsina es una enzima utilizada para romper las proteínas de unión de las células cultivadas a la placa (cadherinas). La funcionalidad de la tripsina es que las células puedan ser suspendidas en una solución y transferidas a placas frescas.

El procedimiento de preparación se enlista a continuación:

- Se diluyen 0,2 [g] de tripsina en 100 [ml] de solución D.
- Se filtra por una membrana con un tamaño de poro de 0,2 [μm].

III.5 Preparación de Cultivos Celulares para Ensayos de citotoxicidad

III.5.1 Materiales y Equipos

Para el cultivo celular se necesitan placas de petri de 9 [cm] de diámetro con el cultivo celular correspondiente, ya sea CNh o UCHT1 que son las líneas celulares evaluadas en este estudio.

Se necesita medio de cultivo suplementado (10% de Suero fetal bovino y antibiótico), Solución D y Tripsina EDTA así como diversas pipetas de vidrio y micro pipetas.

III.5.2 Procedimiento

Los cultivos para los ensayos de laboratorio se preparan en el laboratorio de Terapia Celular en una placa de petri de 9 cm de diámetro. Se asume que en cada placa hay aproximadamente 5 millones de células.

El procedimiento de subcultivo se enlista a continuación:

- Se utiliza una solución D de limpieza para lavar el cultivo celular, es decir, eliminar las células muertas y los restos de nutrientes. (Se realizan dos lavados con 3 [ml] de solución D cada vez)
- Se utilizará tripsina EDTA (2 [ml]) para disociar las células y resuspenderlas en medio de cultivo. Se deja actuar por unos minutos en la incubadora y luego se agregan 2 [ml] de medio de cultivo para neutralizar el efecto de la tripsina. Las células están lista para ser re-sembradas. Se asume que en los 4 [ml] del cultivo celular hay, aproximadamente, 5 millones de células.

III.6 Preparación de subcultivos para Ensayos de Citotoxicidad

III.6.1 Materiales y Equipos

Para realizar un subcultivo se necesitan placas de petri de 9 [cm] de diámetro con las líneas celulares listas para ser re-sembradas y placas de 96 pocillos así como diversas pipetas de vidrio y micro pipetas.

Se necesita medio de cultivo suplementado (10% de Suero fetal bovino y antibiótico). Las células se incuban en una Incubadora a 37 C y 5% de CO₂ marca Forma Scientific.

III.6.2 Procedimiento

Los subcultivos para los ensayos de laboratorio se preparan en el laboratorio de Terapia Celular en la placa de 96 pocillos preparada previamente con las muestras poliméricas.

El procedimiento de subcultivo se enlista a continuación:

- Se dispone de la placa de 96 pocillos (6,4 mm de diámetro por cada pocillo) con los compósitos poliméricos dispuestos anteriormente y se prepara con su respectivo control (0% de células y 100% de células) tal como se muestra en el diagrama de la Figura 20.

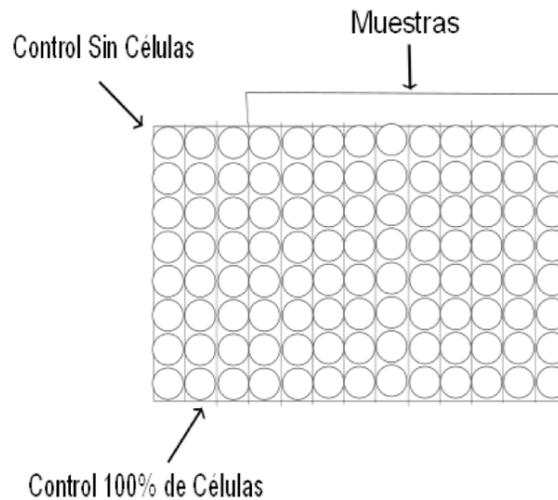


Figura 20. Diagrama Placa Cultivo Celular.

- Se agregan 150 [μ l] de medio aproximadamente por pocillo (el medio tiene que cubrir perfectamente el polímero).
- Las células se siembran, dependiendo de la cantidad requerida (se asume que, en los 4 [ml] del cultivo celular, hay aproximadamente 5 millones de células), en los pocillos correspondientes al control 100% de células y en los pocillos que contengan una muestra polimérica. En los pocillos correspondientes a las muestras poliméricas se dejaron los primeros dos sin células como control. Es decir que, para cada ensayo de citotoxicidad realizado, se tuvieron seis repeticiones por muestra polimérica. La placa de 96 pocillos se lleva a la incubadora a 37°C y 5 % de CO₂ durante 24 horas.

Un diagrama del detalle de un pocillo de la placa de cultivo se muestra en la Figura 21.

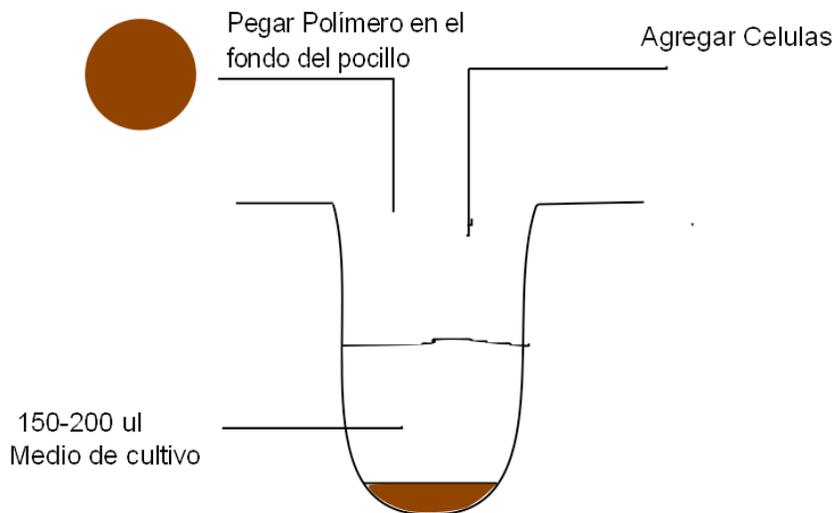


Figura 21. Diagrama de un pocillo de subcultivo para ensayos de viabilidad celular.

III.7 Ensayos de Viabilidad Celular

Para la realización del estudio de la viabilidad celular de los compósitos poliméricos, se utilizaron dos métodos de evaluación de citotoxicidad: el ensayo MTT y el ensayo Live/Dead. La evaluación a partir de dos métodos se realizó para poder tener mayor seguridad de los resultados y compararlos entre sí.

III.7.1 Metodología MTT

III.7.1.1 Materiales y Equipos

Para el ensayo MTT se requieren las placas de 96 pocillos subcultivadas con la línea celular en estudio así como diversas pipetas de vidrio, micro pipetas y pinzas.

Se necesita medio de cultivo sin suero, Solución D, Isopropanol y el reactivo Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5 difeniltetrazólico (MTT).

Los equipos utilizados para este ensayo son: Incubadora marca Forma Scientific a 37°C y 5% de CO₂ y un Lector de Elisa marca Titertek.

III.7.1.2 Procedimiento

Preparación de los reactivos: Este ensayo requiere del reactivo Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5 difeniltetrazólico (MTT) de concentración 5 [mg/ml] e isopropanol. Se añaden 80 [μ l] de MTT por cada 1 [ml] de medio de cultivo por lo que se obtiene una concentración final de reactivo de 0,4 [mg/ml]. Para la preparación del reactivo MTT se diluye el polvo con la solución buffer fosfato PBS (9,6 [g/L] de agua destilada)

El procedimiento a seguir se enlista a continuación:

- Se retira la placa de 96 pocillos de la incubadora. Se descarta el medio. Se lava cuidadosamente cada uno de los pocillos agregando aproximadamente 100 [μ l] de solución D.
- Se agregan 100 [μ l] de medio sin suero (para que no afecte la medición de densidad óptica) + MTT por pocillo (se considera 80 [μ l] de MTT/ ml de medio).
- Se deja incubar a 37°C y 5 % de CO₂ por 2-3 horas para permitir la formación de los cristales de formazan. Estos cristales quedan retenidos por las células.
- Se elimina el sobrenadante y se añaden 200 [μ l] de isopropanol por pocillo. Esto provoca la solubilización del formazan. Se deja actuar por unos minutos a temperatura ambiente.
- Se realiza la lectura de densidad óptica en un espectrofotómetro (Lector Elisa) a una longitud de onda de 540 [nm].

En la Figura 22 se muestra un diagrama del procedimiento previamente descrito para en ensayo MTT. En la figura se puede observar el procedimiento a seguir para un pocillo de la placa de cultivo correspondiente a una muestra en estudio. Cabe señalar que se procede de igual forma para el resto de las muestras.

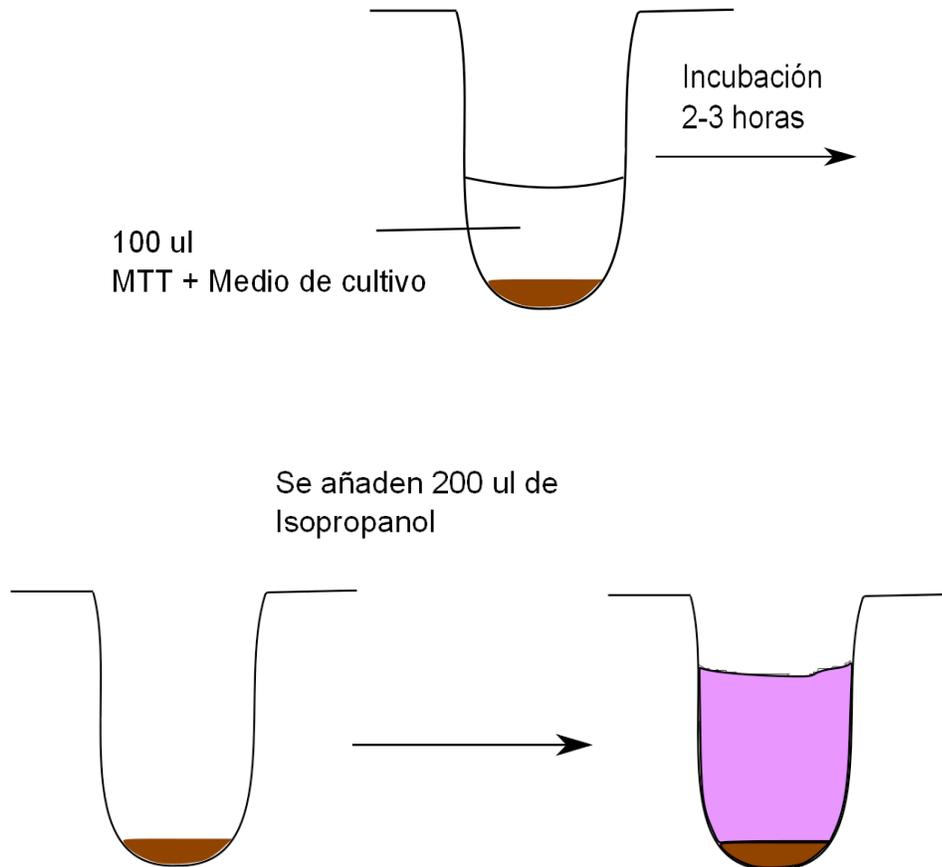


Figura 22. Diagrama de Procedimiento para Ensayo de Viabilidad Celular MTT.

III.7.2 Metodología Live/Dead

III.7.2.1 Materiales y Equipos

Para el ensayo Live/Dead se requieren las placas de 96 pocillos subcultivadas con la línea celular en así como diversas pipetas de vidrio, micro pipetas y pinzas. Además se requiere de Porta-Objetos y Medio de Montaje para observar los resultados al microscopio.

Se necesita medio de cultivo sin suero, Solución D, PBS y los reactivos Calceína AM (CAM) e Ioduro de Propidio (IP).

Los equipos utilizados para este ensayo son: incubadora marca Forma Scientific a 37°C y 5% de CO₂ y un microscopio de fluorescencia marca Olympus.

III.7.2.2 Procedimiento

Preparación de los reactivos: Los reactivos se agregarán simultáneamente al cultivo por lo que se necesita una mezcla de ellos a una concentración tal de 2 [μM] de la Calceína AM y 4 [μM] del Ioduro de Propidio (IP). Los reactivos se diluyen con la solución buffer fosfato PBS (9,6 [g/L] de agua destilada).

El procedimiento a seguir se enlista a continuación:

- Se retira la placa de 96 pocillos de la incubadora. Se descarta el medio. Se lava cuidadosamente cada uno de los pocillos agregando aproximadamente 100 [μl] de solución D.
- Se agregan 20-50 [μl] de reactivos por pocillo de tal forma de cubrir toda la superficie del disco de polímero.
- Se deja incubar a 37°C y 5 % de CO₂ por 30-45 minutos.
- Se sacan los discos poliméricos cuidadosamente de la placa de cultivo y se ponen en unos portaobjetos de tal forma que las células adheridas al polímero queden hacia abajo y se mira al microscopio de fluorescencia. Preparar los portaobjetos con una gota de medio de montaje antes de poner el polímero.

En la Figura 23 se muestra un diagrama del procedimiento previamente descrito para en ensayo Live/Dead. Al igual que para el ensayo MTT, en la figura se puede observar el procedimiento a seguir para un pocillo de la placa de cultivo correspondiente a una muestra en estudio. Cabe señalar que se procede de igual forma para el resto de las muestras.

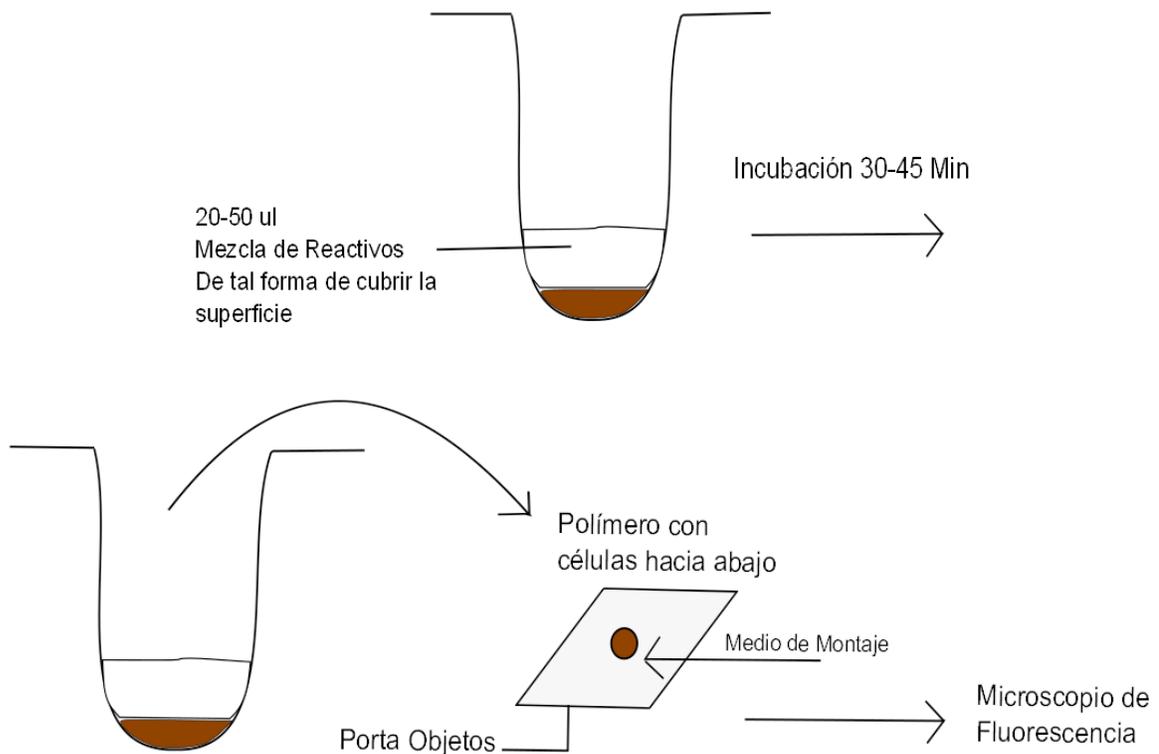


Figura 23. Diagrama de Procedimiento para Ensayo de Viabilidad Celular Live/Dead.

III.8 Ensayo de Liberación de Iones Cobre

Para simular las condiciones reales de lixiviación se tendría que haber hecho la medición en medio de cultivo. Esto último fue imposible dado que el medio de cultivo tiene una alta concentración de sales y no se tiene una tecnología disponible para medir en estas condiciones. Se reemplazó el medio de cultivo por agua desionizada.

III.8.1 Materiales y Equipos

La medición de iones cobre se realizó en agua desionizada. Se utilizó una técnica de colorimetría para medir absorbancia a una longitud de onda de 455 [nm]. El equipo utilizado es un espectrofotómetro UV visible modelo Jenway 6320D.

Para el ensayo de lixiviación se necesitan pipetas (de 5 y 10 [ml]), una micropipeta de 1 [ml], matraces aforados de 100 y 500 [ml], gradillas, probetas, tubos de ensayo de plástico de 15 y 50 [ml], tubos para centrifuga de 50 [ml], una balanza marca Preciza, un agitador magnético marca ARE y un sonicador portátil Transonic de Elma.

Para realizar el ensayo se requieren los siguientes reactivos:

- Agua desionizada obtenida en el Centro de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología de la FCFM, Universidad de Chile.
- Hidroxilamina encristales de Merck.
- Acetato de sodio trihidratado de Merck.
- Ácido acético 100% de Merck.
- Neocuproína de Merck.
- Etanol absoluto o técnico al 95% de Equilab.

Además se requieren placas de 2x3 [cm²] y 1 [mm] de espesor de cada muestra para el caso de los compósitos poliméricos de polipropileno y 10 esferas de hidrogel por cada muestra para los compósitos poliméricos de alginato.

III.8.2 Procedimiento

Preparación de los reactivos:

- Hidroxilamina al 10%: Se disuelven 10 [gr] de cristales de hidroxilamina en agua desionizada en un matraz de 100 [ml]. Se selló el matraz con un film y se sonicó durante 10 minutos para homogenizar la solución.
- 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 fue 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].

- Solución Buffer: Se mezclan 107 [ml] de acetato de sodio y 93 [ml] de ácido acético 0,1 M en una probeta de 200 [ml]. La mezcla se agitó durante aproximadamente 20 minutos en el agitador magnético.
- Neocuproína: Se disuelven 0,04 [gr] de neocuproína y 10 [ml] de etanol absoluto en agua desionizada en un matraz de 100 [ml]. Se selló el matraz con un film y se sonicó durante aproximadamente 20 minutos hasta observar homogeneidad de la mezcla.

Para realizar el ensayo se sumergen las muestras de compósitos en 40 [ml] de agua desionizada en tubos de ensayos plásticos de 50 [ml].

Se realizan tres mediciones cada 2 horas el primer día, una medición a las 24 horas y una a las 96 horas.

Para cada medición se realiza el siguiente procedimiento:

- Se extraen 3 [ml] de cada muestra en duplicado y se colocan en tubos de ensayos plásticos de 15 [ml]. El resto de agua, donde las muestras están sumergidas, se desecha y cambia por 40 [ml] de agua desionizada limpia. Además se realiza un blanco con 3 [ml] de agua desionizada.
- Se agregan, a cada muestra de 3 [ml] y al blanco, 1 [ml] de cada uno de los tres reactivos siguientes en ese orden estricto:
 1. Hidroxilamina al 10%
 2. Solución Buffer
 3. Neocuproína
- Se agitan las mezclas y se mide absorbancia de todas las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 455 [nm] calibrando previamente con el blanco. El equipo mide luz absorbida que dependerá 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.

Para realizar la conversión entre absorbancia y concentración se utilizó la curva de calibración del espectrofotómetro que se muestra en el Gráfico 1.

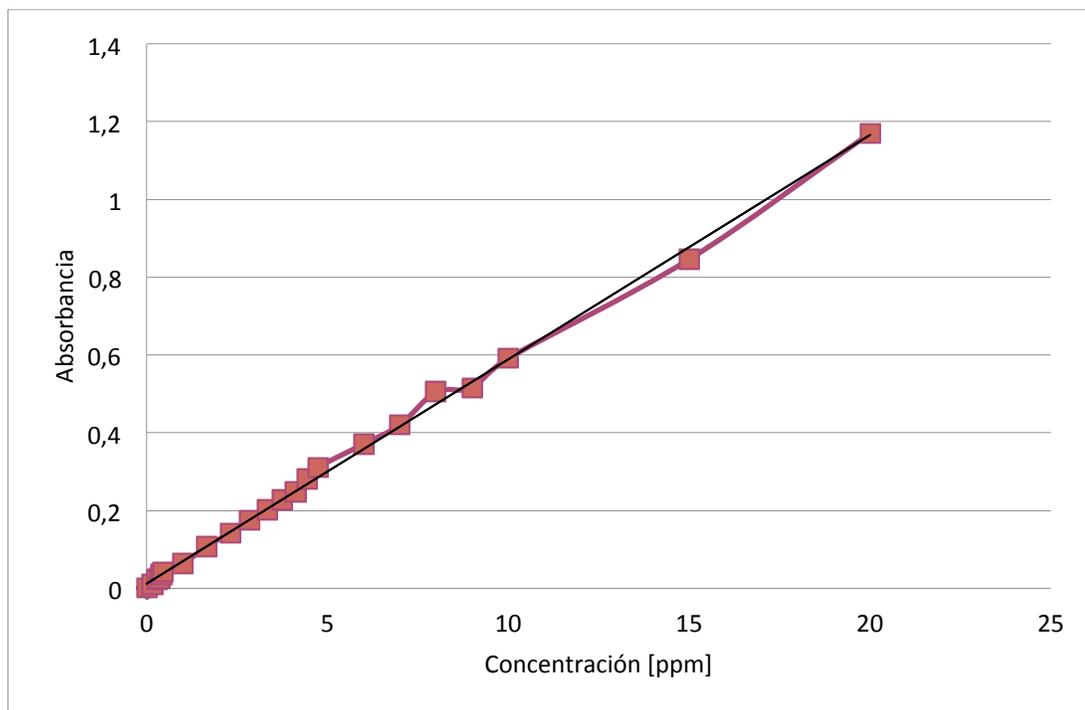


Gráfico 1. Curva de calibración del espectrofotómetro

El procedimiento detallado anteriormente difiere un poco cuando se trata de realizar el ensayo de liberación de iones para las nanopartículas de cobre comerciales. Este procedimiento se explica a continuación:

- Se vierten 40 [ml] de agua desionizada sobre 0,05 [g] de nanopartículas de cobre en un tubo para centrifuga de 50 [ml].
- Antes de realizar cada medición se deben centrifugar las muestras a 190 [rpm] por 15 minutos.
- Se extraen 3 [ml] de cada muestra en duplicado y se colocan en tubos de ensayos plásticos de 15 [ml]. Se agregan 3 [ml] de agua desionizada limpia en cada una de las muestras para mantener intacto el volumen de 40 [ml] de los tubos de ensayo.
- Se realiza un blanco con 3 [ml] de agua desionizada y se agrega 1 [ml] de cada uno de los tres reactivos en orden al blanco y a las muestras de 3 [ml].

- Se agitan las mezclas y se mide absorbancia de todas las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 455 [nm] calibrando previamente con el blanco.

Al igual que para los compósitos poliméricos se realizaron tres mediciones cada 2 horas el primer día, una medición a las 24 horas y una a las 96 horas.

III.9 Análisis Estadístico de Tukey

Para cada uno de los gráficos de barra, que se pueden ver en el capítulo IV: Resultados y Discusiones, se muestra un promedio de los datos obtenidos para cada muestra y se cuenta con las barras de error correspondiente a la desviación estándar entre los diferentes datos experimentales. Además, en cada caso, se realizó el análisis estadístico de Tukey para ver las diferencias significativas que hay entre las diferentes muestras y el control, y entre las muestras en caso de ser necesario.

Para mayor información sobre este análisis ver el Anexo VII.1.

Capítulo IV Resultados y Discusión

IV.1 Citotoxicidad de compósitos de polipropileno con nanopartículas de cobre por ensayo MTT: Estudio sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh)

Para estudiar la citotoxicidad de los compósitos de polipropileno con nanopartículas de cobre se implementaron los métodos MTT y Live/Dead explicados anteriormente. En esta sección se muestran las modificaciones realizadas a la superficie del polímero y los resultados obtenidos de citotoxicidad para células CNh por el método MTT.

Para realizar el ensayo MTT se subcultivaron las células sobre el polímero y se dejó en incubadora por 24 horas. Este es el tiempo aproximado máximo que se puede dejar el cultivo antes de requerir un cambio de medio de cultivo por las dimensiones del pocillo con el que se está trabajando.

El ensayo se realizó para los polímeros sin ninguna modificación: polipropileno blanco y polipropileno mezclado con 10% y 20% p/p de nanopartículas de cobre contenidas en un masterbatch de polybond. El ensayo se realizó, también, para una muestra de masterbatch pura (50% de polybond, 50% de nanopartículas de cobre).

Se realizó el análisis Tukey a los resultados comparando todas las muestras con el control y todas las muestras entre sí. Se obtuvo el nivel de significancia para los casos en los que hay diferencias significativas.

Los resultados de citotoxicidad se muestran en el Gráfico 2. Para mayor detalle sobre los resultados ver la tabla 15 que se adjunta anexo VII.2.

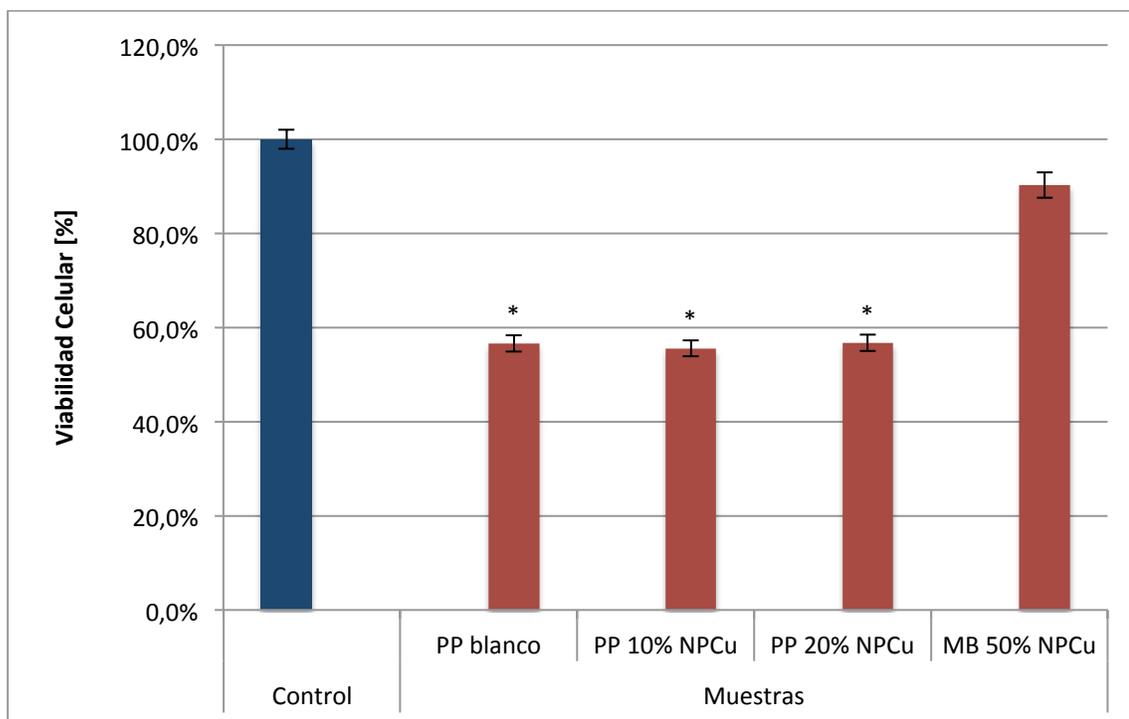


Gráfico 2. Viabilidad celular de los cultivos de CNH en presencia de polipropileno con nanopartículas de cobre. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): p<0.01 comparado con el control y comparado con la muestra de MB 50% de NPCu.

En el Gráfico 2 se observa una diferencia significativa entre el control (pocillo sin muestra polimérica) y las tres primeras muestras poliméricas. La diferencia observada, que corresponde a aproximadamente 40%, se puede deber a la baja adherencia celular que tiene la superficie del polipropileno por ser apolar y no a una mortalidad celular a causa del cobre contenido en los compósitos poliméricos porque no se observan diferencias significativas entre las muestras de polipropileno con cobre y aquella sin cobre. Las células no se estarían adhiriendo en su totalidad al polímero y, como se trata de células que necesitan adherirse a una superficie para sobrevivir, mueren y son eliminadas con la solución D al lavar el cultivo.

No se observa toxicidad manifiesta del cobre comparando la muestra de polipropileno blanco con las muestras de polipropileno con 10% p/p de nanopartículas de cobre y con 20% p/p de nanopartículas de cobre. Las tres muestras alcanzan un valor aproximado de viabilidad celular del 60% y no hay diferencias significativas entre ellas.

En cuanto a la última muestra, esta corresponde a una muestra de masterbatch de polybond con 50% p/p de nanopartículas de cobre. Se puede observar que se obtiene una mayor viabilidad celular con respecto a las muestras de polipropileno alcanzando alrededor de un 90%. Esto se debe probablemente a la composición de esta muestra que tiene polybond puro en vez de una mezcla de polipropileno con polybond. El alto porcentaje de viabilidad celular se explica por las propiedades del polybond que se analizarán a continuación.

Según el análisis Tukey realizado hay diferencias significativas comparando las tres primeras muestras (PP blanco, PP con 10% de NPCu y PP con 20% de NPCu) y el control y las tres primeras muestras y la última muestra (MB con 50% de NPCu). Ambas con un p-valor $p < 0,01$.

IV.1.1 Polybond como matriz polimérica

Para explicar la alta viabilidad celular observada con la muestra de polybond con 50% de NPCu se efectuó un sub-estudio de MTT con Polybond puro. Esto para poder estudiar y analizar el comportamiento de las células en presencia de este compuesto de polybond.

Los resultados de citotoxicidad del polybond se pueden observar en el Gráfico 3. Para mayor detalle sobre los resultados ver la tabla 16 que se adjunta anexo VII.2.

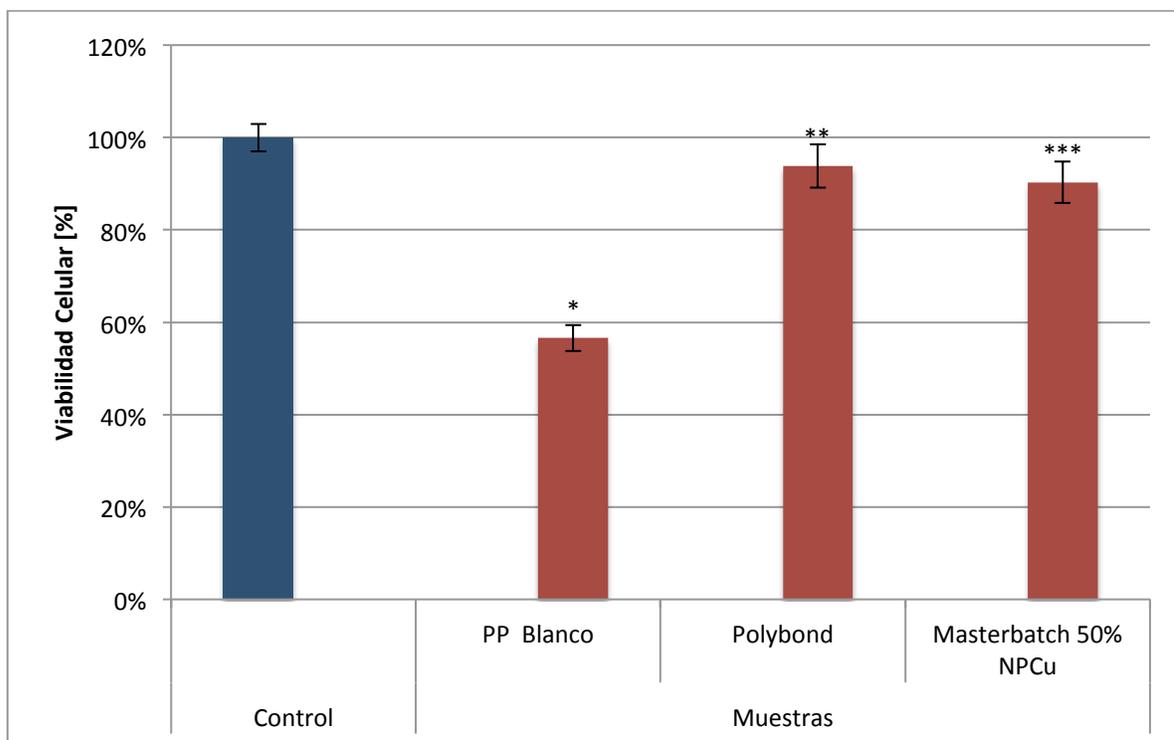


Gráfico 3. Viabilidad celular de los cultivos de CNh en presencia de los Polímeros Polybond y Masterbatch 50% NPCu. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): $p < 0.01$ comparado con el control, **(**)**: $p < 0.01$ comparado con la muestra de PP blanco, **(***)**: $p < 0.05$ comparado con la muestra de PP blanco.

Se observa que ambas muestras, tanto el polybond como el masterbatch con 50% de nanopartículas de cobre, alcanzan una viabilidad celular alta, cercana al 100% y no hay diferencias significativas entre ellas. Se puede decir, por lo tanto, que el cobre en el compuesto de polybond no es tóxico para las células.

La alta viabilidad celular observada para las muestras de polybond se debe, como se había dicho anteriormente, a la estructura de este. El polybond es un polímero de polipropileno modificado con anhídrido maleico. El anhídrido maleico es una molécula polar que está modificando la estructura apolar del polipropileno como se puede observar en la Figura 24. Esta molécula polar de anhídrido maleico es la responsable de la buena adherencia celular de este compuesto.

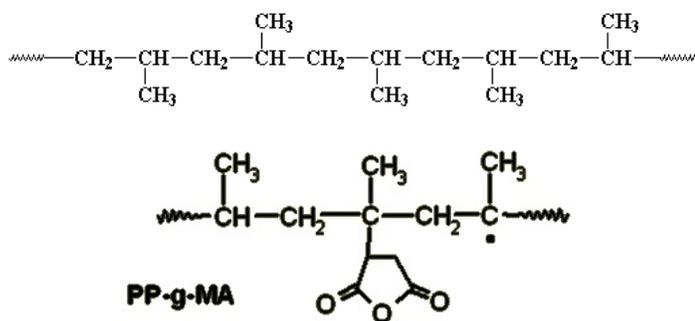


Figura 24. Comparación de la estructura del polipropileno y del polipropileno injertado con anhídrido maleico.

Estos resultados muestran al polybond como una buena alternativa de matriz celular debido a su estructura. Sin embargo su utilización en aplicaciones médicas no es muy factible dado que se trata de un material muy quebradizo.

IV.1.2 Estudios complementarios de evaluación de adherencia celular del polipropileno

Se realizó un ensayo para evaluar la real adherencia celular en el polímero de polipropileno. Hay algunas células que podrían estar adhiriéndose a la superficie de las paredes del pocillo o a cualquier espacio donde no se encuentre el polímero de tal forma de evitarlo.

El ensayo de adherencia se realizó luego del cultivo de 24 horas y consistió en retirar las muestras poliméricas de la placa de cultivo y ponerlas en una nueva placa. Se realizó el ensayo MTT tanto para la placa donde se retiró el polímero como para la placa con la muestra de polímero. Esto nos permitió ver cuántas células se están adhiriendo realmente en el polímero y cuantas en la superficie de la placa de cultivo.

Los resultados se muestran en los siguientes gráficos. Para mayor detalle sobre los resultados ver las tablas 17 y 18 que se adjuntan anexo VII.2.

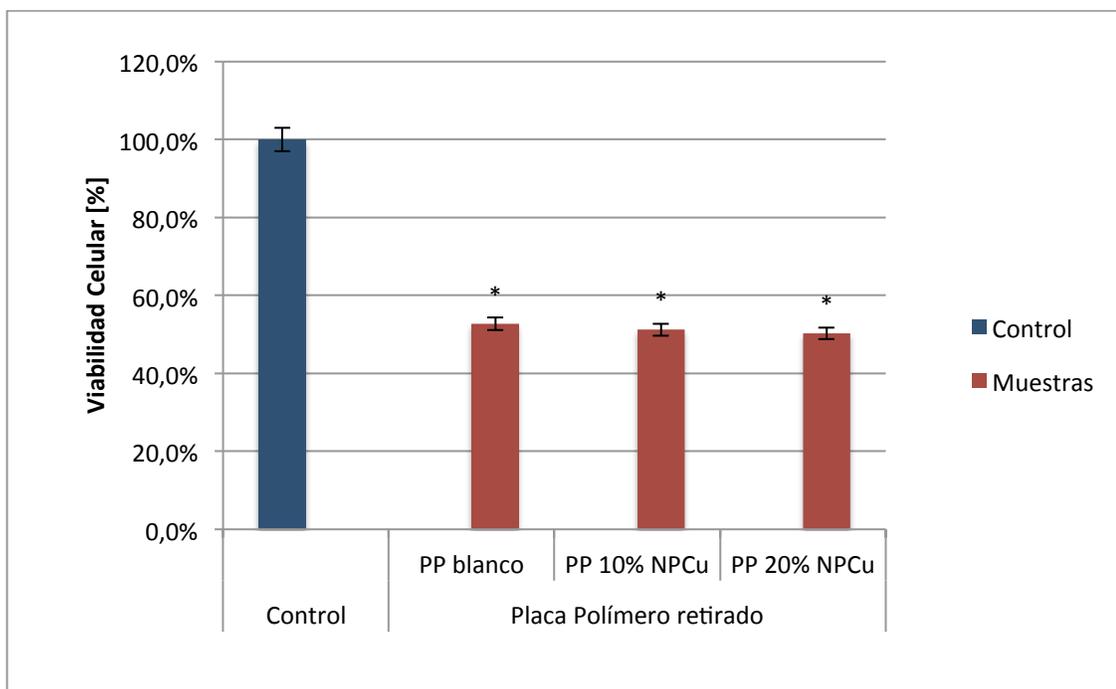


Gráfico 4. Viabilidad celular de los cultivos de CNh en la placa donde se retiró el polímero. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): p<0.01 comparado con el control.

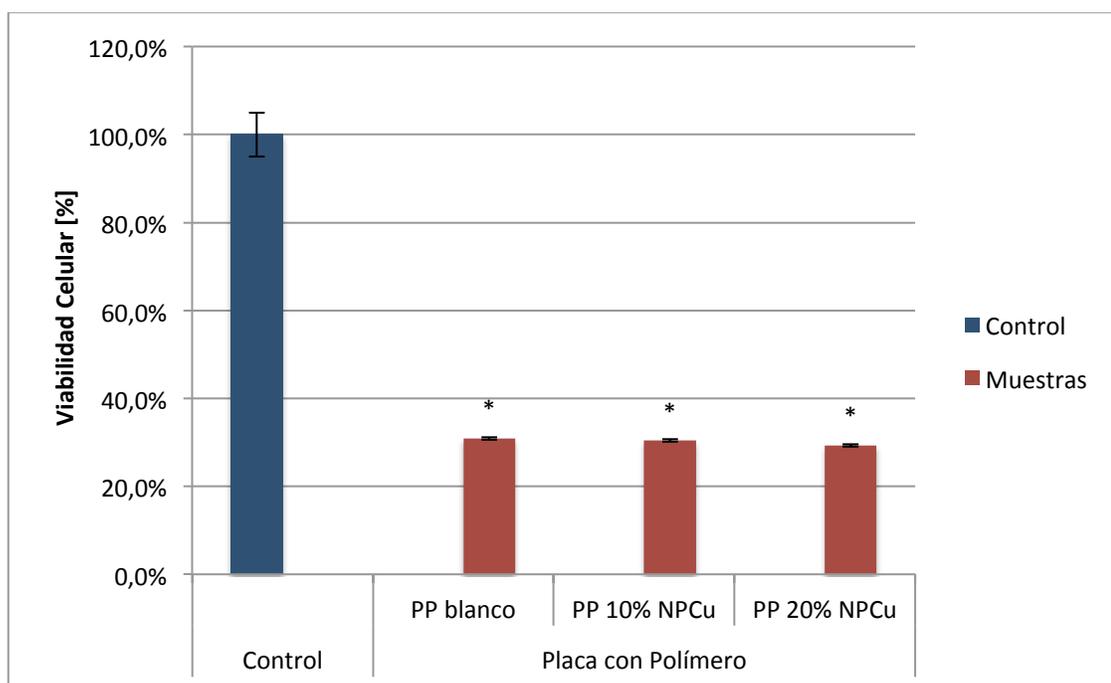


Gráfico 5. Viabilidad celular de los cultivos de CNh en la placa con las muestras poliméricas. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): p<0.01 comparado con el control.

Se observa que la adherencia celular obtenida en el Gráfico 4, correspondiente a la adherencia celular en la placa de cultivo (aproximadamente 50% para los tres casos) es

mucho mayor que la obtenida en el Gráfico 5, es decir la del polímero en sí (aproximadamente 30%). Se confirma la mayor adherencia celular sobre la pared de la placa de cultivo evitando así el compuesto polimérico.

Al sumar ambos porcentajes, es decir el correspondiente a la adherencia celular en la placa de cultivo y el correspondiente al polímero retirado (aproximadamente 80%), se observa que es un poco superior al resultado obtenido para las muestras de polipropileno no modificado en el Gráfico 2 (aproximadamente 60%) siendo que debieran ser iguales. Esto se debe al factor de ruido que tiene el espectrofotómetro que lee los resultados de absorbancia y que en este caso se aplica dos veces al estar realizando dos ensayos.

IV.1.3 Ensayos de modificación de la superficie del polipropileno

En este ensayo se buscó mejorar la adherencia celular en los polímeros de polipropileno, utilizando células CNh. Para esto se probaron dos formas de modificación de la superficie del polímero. Se trabajó con el polímero funcionalizado por plasma y con polímero con gelatina. La funcionalización oxida el polímero haciendo la molécula más polar. La gelatina le agrega carga a la superficie del polímero. Se evaluaron ambas alternativas por separado y juntas.

El análisis de Tukey, en este caso, se realizó solamente entre las muestras y el control y entre cada muestra sin modificar con sus correspondientes modificaciones, excluyendo un análisis comparativo entre las diferentes muestras ya que esto ya se realizó anteriormente.

Los resultados del ensayo se pueden observar en el Gráfico 6. Para mayor detalle sobre los resultados ver la Tabla 19 que se adjunta anexo VI.3.

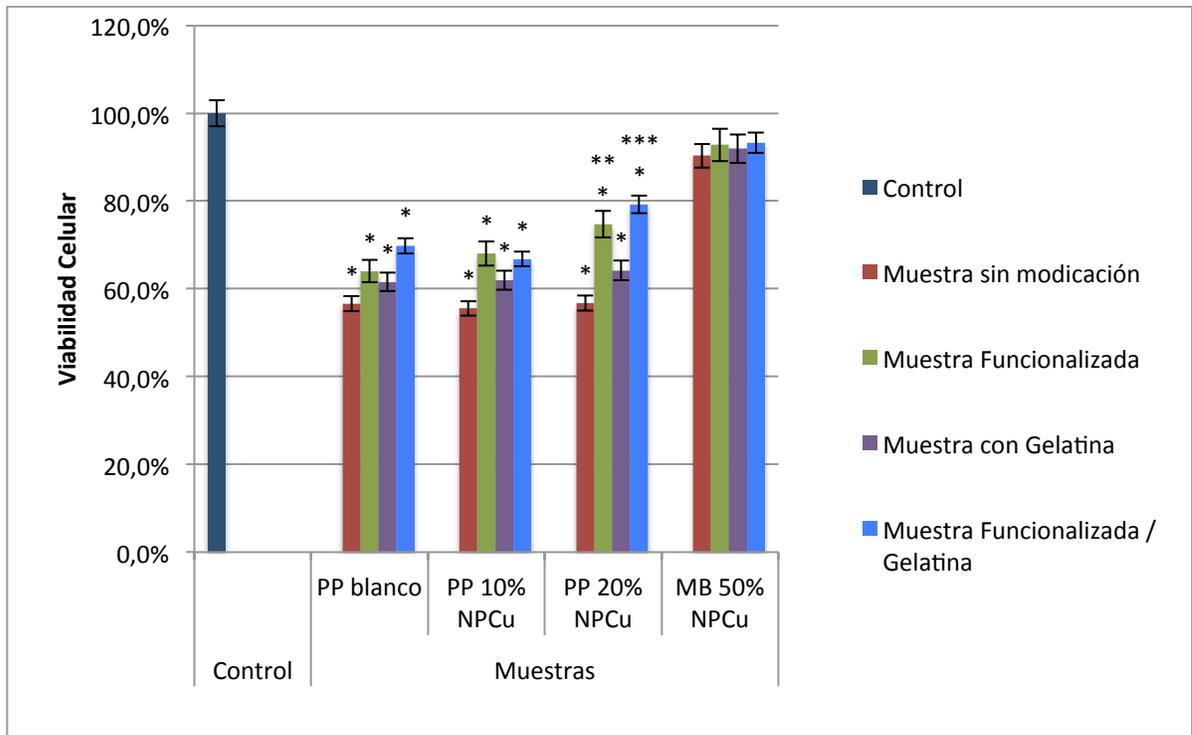


Gráfico 6. Viabilidad celular de los cultivos de CNh en presencia de polímeros modificados para mejorar la adherencia celular. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): p<0.01 comparado con el control, (): p<0.05 comparado con la muestra de PP con 20% de NPCu sin modificar, (***): p<0.01 comparado con la muestra de PP con 20% de NPCu sin modificar.**

El Gráfico 6 muestra que al modificar la superficie del polímero, ya sea por funcionalización o con gelatina, aumenta la adherencia celular de polipropileno. Por ambos métodos aumenta la adherencia celular por lo tanto se optó por combinar los métodos y usar la técnica del polímero funcionalizado con gelatina para los ensayos realizados con la técnica Live/Dead y aquellos que se realizaron sobre la línea celular UCHT1.

Se realizó el mismo ensayo que para el polímero no modificado para evaluar la real adherencia celular en el polímero de polipropileno. Los resultados se muestran en los siguientes gráficos. Para mayor detalle sobre los resultados ver las tablas 20 y 21 que se adjuntan anexo VII.3.

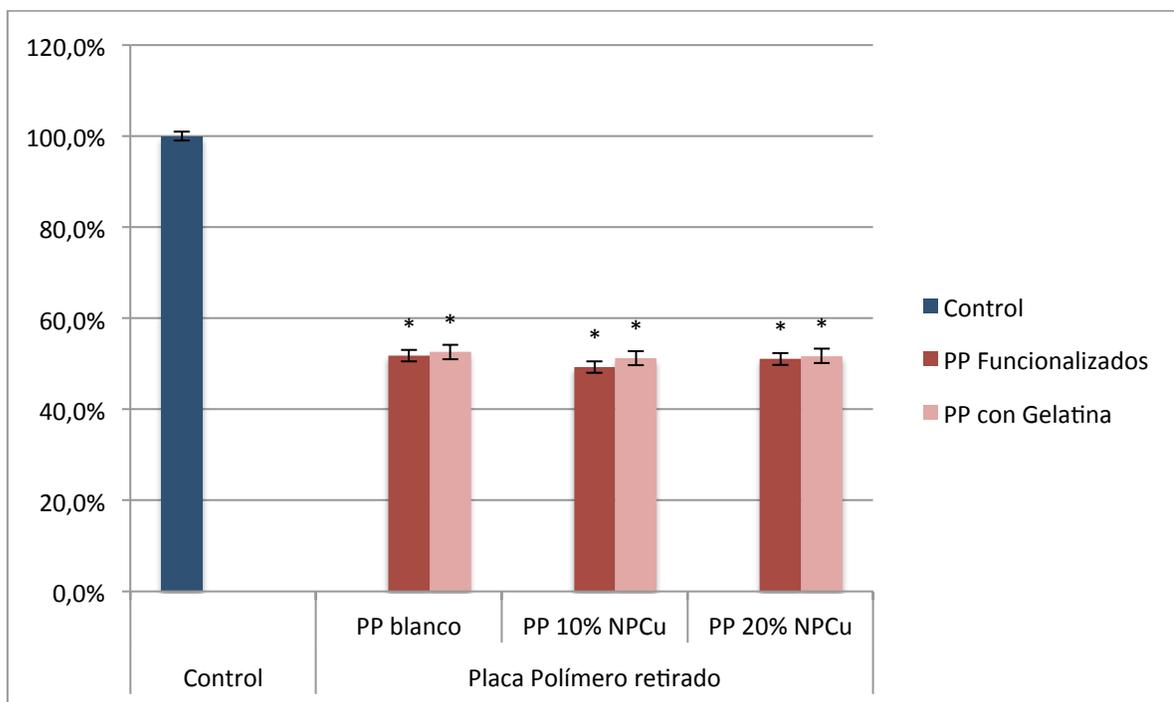


Gráfico 7. Viabilidad celular de los cultivos CNh en la placa donde se retiró el polímero modificado. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): p<0.01 comparado con el control.

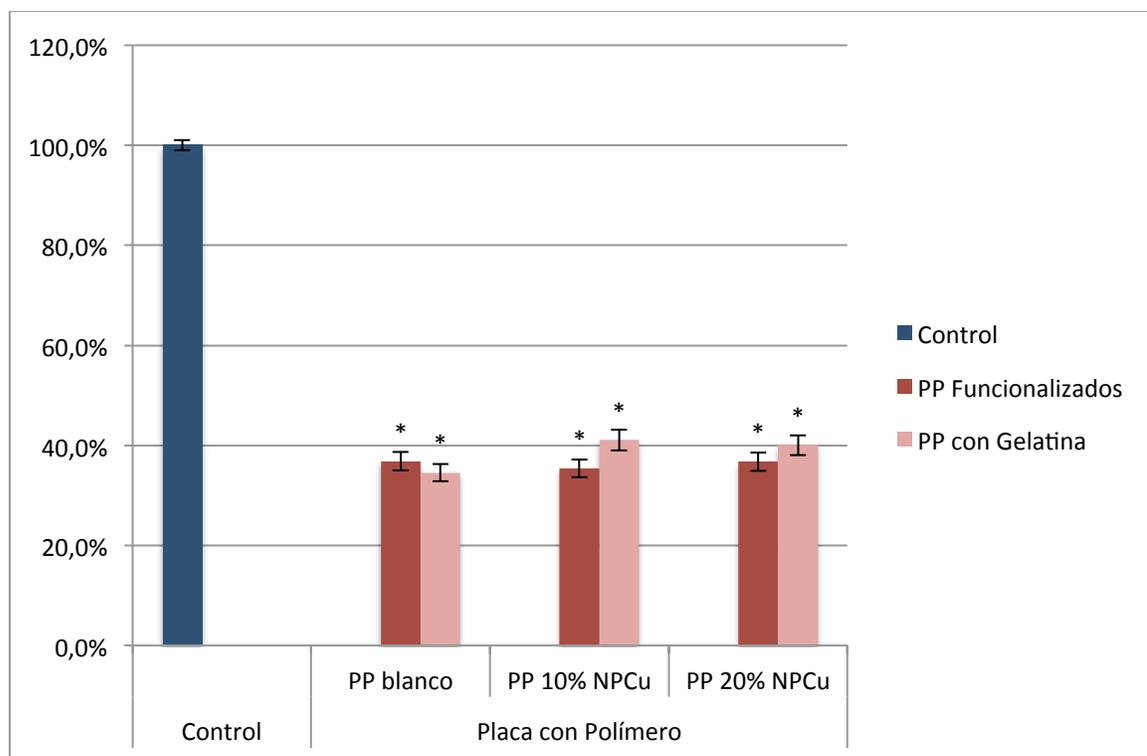


Gráfico 8. Viabilidad celular de los cultivos CNh en la placa con las muestras poliméricas modificadas. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): p<0.01 comparado con el control.

Se observa que la adherencia celular obtenida en el Gráfico 7, correspondiente a la adherencia celular en la placa de cultivo (aproximadamente 50% para los tres casos) es un poco mayor que la obtenida en el Gráfico 8, es decir la del polímero modificado en sí (aproximadamente 40%). Se confirma que aún es mayor la adherencia celular sobre la pared de la placa de cultivo, evitando así el compuesto polimérico. Sin embargo, se destaca que la diferencia se acortó bastante con respecto al caso del polímero no modificado ya que la adherencia celular en el polímero aumentó (de aproximadamente 30% a aproximadamente 40%) y la adherencia celular en la pared de la placa de cultivo se mantuvo aproximadamente igual (alrededor de 50%).

Al sumar ambos porcentajes, es decir el correspondiente a la adherencia celular en la placa de cultivo y el correspondiente al polímero modificado retirado (aproximadamente 90%), se observa que es un poco superior al resultado obtenido para las muestras de polipropileno modificado en el Gráfico 6 (aproximadamente 70%) siendo que debieran ser iguales. Esto se debe al factor de ruido que tiene el espectrofotómetro que lee los resultados de absorbancia y que en este caso se aplica dos veces al realizar dos ensayos.

IV.1.4 Resumen de resultados de citotoxicidad de compósitos de polipropileno sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh)

Para sintetizar de una mejor forma los resultados obtenidos, éstos se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Resumen de los porcentajes de viabilidad celular de los cultivos de CNh en presencia de los compósitos de polipropileno.

	Polybond	PP0320 Blanco	PP0320 10% NPCu	PP0320 20% NPCu	Masterbatch 50% NPCu
Muestra sin modificación	93,8%	56,6%	55,6%	56,7%	90,3%
Muestra Funcionalizada	95,4%	64,0%	68,0%	74,7%	92,8%
Muestra con Gelatina	94,4%	61,6%	62,0%	64,2%	91,9%
Muestra Funcionalizada /Gelatina	97,1%	69,8%	66,8%	79,2%	93,3%

IV.2 Citotoxicidad de compósitos de polipropileno con nanopartículas de cobre por ensayo Live/Dead: Estudio sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh)

Para realizar el ensayo se subcultivaron las células CNh sobre el polímero, funcionalizado y con gelatina, y se dejó en incubadora por 24 horas al igual que para el ensayo MTT. Luego del cultivo, los reactivos del ensayo estuvieron en contacto con las células por 30-45 minutos aproximadamente.

Se retiran los discos poliméricos de la placa de cultivo y se ponen en porta-objetos de tal forma que las células adheridas al polímero queden hacia abajo.

Los resultados se observaron en el microscopio de fluorescencia y, una vez obtenidas las imágenes, las células se contaron con el programa Image J.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 25.

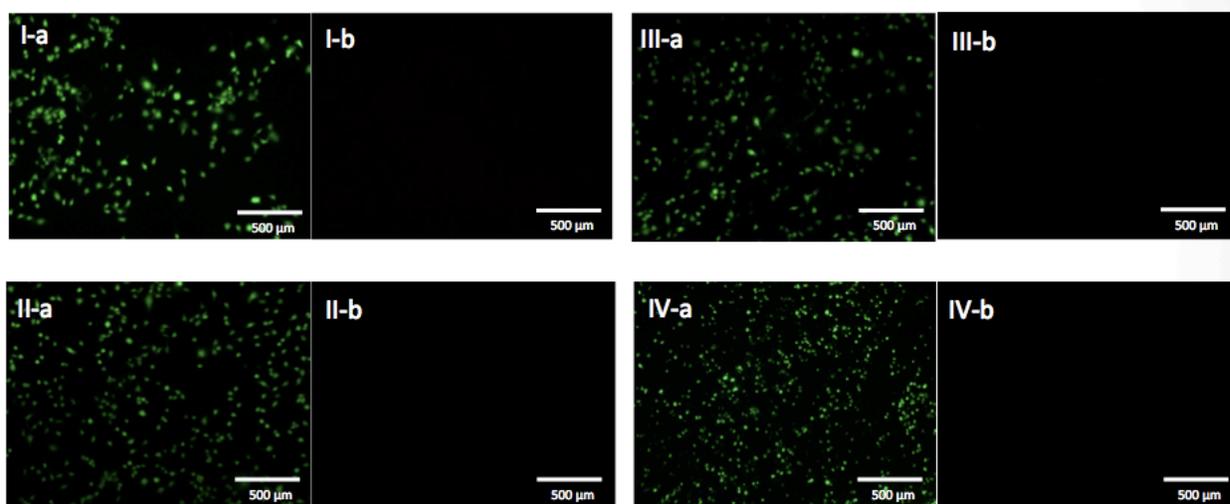


Figura 25. Imágenes de Microscopio de Fluorescencia del ensayo Live/Dead para células CNh para (I) Polipropileno Blanco, (II) Polipropileno con 10% de NPCu, (III) Polipropileno con 20% de NPCu, (IV) Polybond con 50% de NPCu. a- Fluorescencia Verde para células vivas; b- Fluorescencia Roja para células muertas.

Las imágenes de la Figura 25 corresponden a un área de 3,7 [mm²] de un total de 19,6 [mm²] de las muestras poliméricas. Se confirma que hay células vivas que se están adhiriendo al polímero por la cantidad de células fluorescente verdes observadas en estas imágenes.

A partir de las imágenes, se puede decir también que no hay citotoxicidad relativa a las nanopartículas de cobre ya que no se observan mayores diferencias entre la imagen de células vivas correspondientes al polímero blanco (I-a) y las imágenes de células vivas correspondientes a los polímeros de polipropileno con 10% y 20% de NPCu (II-a y III-a) y de polybond con 50% de NPCu (IV-a).

En las imágenes de fluorescencia no se logran visualizar células muertas esto ya que las células que murieron en presencia de los compósitos poliméricos fueron retiradas con el lavado que se le realizó al cultivo con solución D.

Se contaron las células vivas en cada caso con el programa Image J como se observa en la Figura 26 correspondiente a la muestra de polipropileno blanco.

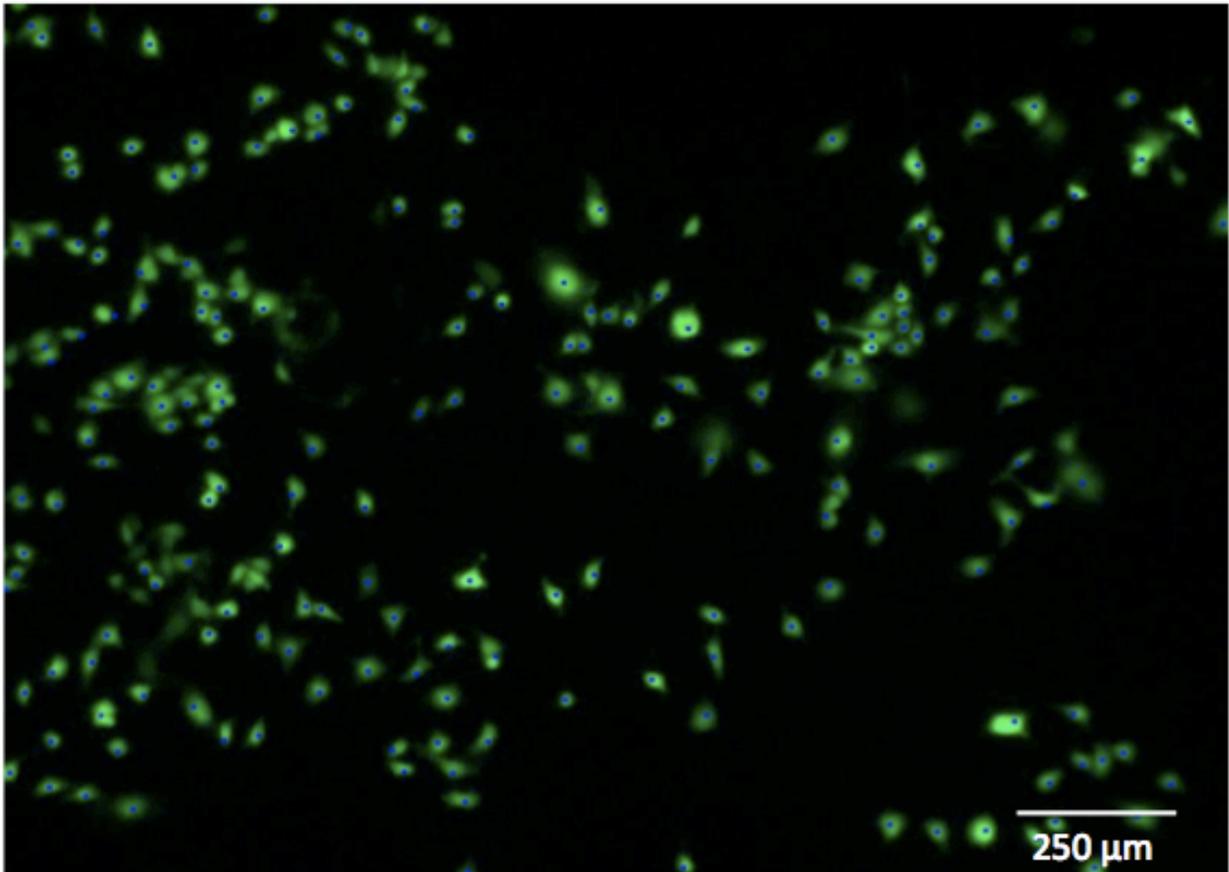


Figura 26. Contador de células de Image J para la muestra de polipropileno blanco.

En la Figura 26 se puede observar la imagen de fluorescencia Live/Dead de células vivas para la muestra de polipropileno blanco. El contador de células es una herramienta de Image J que permite contar los diferentes tipos de células en una imagen. En este caso se trata de un solo tipo de células (CNh) marcadas con un punto azul.

Para identificar las células en la imagen de fluorescencia se tienen que observar, en primer lugar, en el microscopio óptico. Esto no se puede realizar en este estudio ya que los compósitos contienen cobre por lo que tienen un color marrón oscuro y no se pueden ver las células adheridas a este. Por lo tanto se realizó el siguiente supuesto para el análisis de cada una de las imágenes de fluorescencia: Se consideró como célula viva todo elemento verde fluorescente de la figura. El resultado corresponde a una aproximación del número de células adheridas en una parte de la superficie del compósito como se especificó anteriormente.

Los resultados obtenidos del ensayo Live/Dead correspondiente a todas las muestras estudiadas para células CNh se muestran en la Tabla 10. Para todos los casos se realizó un promedio entre 4 imágenes de fluorescencia de la muestra para tener un resultado más significativo de toda la muestra polimérica.

Tabla 10. Resultado ensayo Live/Dead para el polipropileno con nanopartículas de cobre para células CNh.

	PP0320 Blanco	PP0320 10% NPCu	PP0320 20% NPCu	Masterbatch 50% NPCu
Células Vivas	200 ± 7,8	213 ± 12,5	194 ± 11,6	338 ± 14,3
Células Muertas	0	0	0	0

La Tabla 10 confirma que no hay mayores diferencias entre el número de células vivas adheridas a las muestras de polipropileno blanco, con 10% y 20% p/p de nanopartículas de cobre.

Se observa que el número de células adheridas a la muestra de masterbatch de polybond con 50% p/p de NPCu es significativamente mayor que el de las otras muestras. Este resultado ratifica lo observado en la imagen de fluorescencia y la buena adherencia del polybond.

IV.3 Citotoxicidad del polipropileno con nanopartículas de cobre en un periodo de tiempo más prolongado (96 horas): Estudio sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh)

Se realizó un ensayo para verificar si el tiempo en contacto de las células con el compuesto polimérico es un factor significativo de citotoxicidad. Esto ya que se sabe que en mayor tiempo, el compuesto polimérico debiera liberar una mayor cantidad de iones cobre.

Para esto, se preparó la placa con las muestras poliméricas y el medio de cultivo y se dejó en la incubadora. Luego de 72 horas en la incubadora, se retiró la placa y se subcultivaron las células sobre el polímero. Se dejó la placa de cultivo en la incubadora por 24 horas más. Las muestras poliméricas evaluadas fueron previamente funcionalizadas y se les agregó gelatina para mejorar la adherencia del polipropileno.

Se utilizó, en este caso, el ensayo MTT para evaluar la citotoxicidad de los compósitos. Los resultados se muestran en el Gráfico 9. Para mayor detalle sobre los resultados ver la Tabla 22 que se adjunta anexo VII.4.

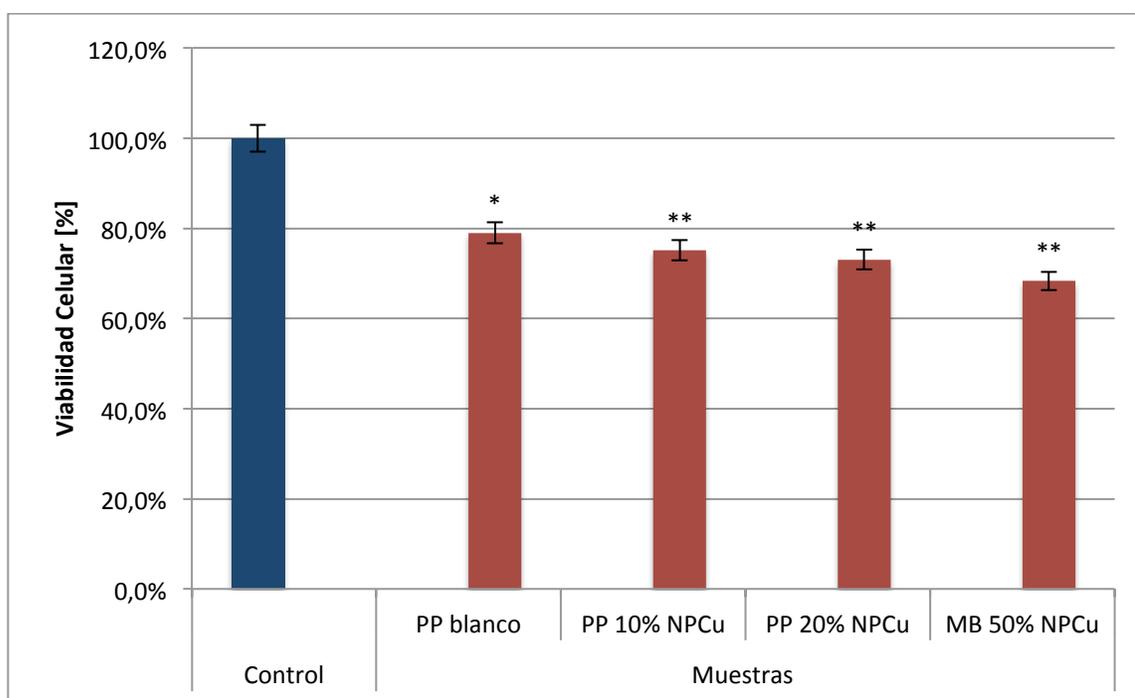


Gráfico 9. Viabilidad celular de los cultivos de CNh en presencia de polipropileno con NPCu en 96 horas. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): p<0.05 comparado con el control, (): p<0.01 comparado con el control.**

En el Gráfico 9 se pueden observar leves diferencias entre la muestra de polipropileno blanco y las muestras con nanopartículas de cobre. Sin embargo estas diferencias no son significativas como para apreciar una real citotoxicidad de las nanopartículas de cobre en estas condiciones. Es importante comparar estos resultados con las muestras que estuvieron solo 24 horas en contacto con las células para ver si hay diferencias importantes entre ambos casos.

IV.3.1 Comparación de citotoxicidad de las muestras de polipropileno sobre células CNh en 24 horas y en 96 horas

En esta sección se busca comparar los resultados de citotoxicidad obtenidos, sobre células CNh, con un tiempo de exposición con el polímero de 24 horas y aquellos obtenidos con un tiempo más prolongado de 96 horas. Para esto se compara el Gráfico 9 con el Gráfico 6 de viabilidad celular de los cultivos de CNh en presencia de los polímeros modificados por 24 horas, específicamente con la muestra de polipropileno funcionalizado con gelatina.

El análisis de Tukey, en este caso, se realizó solamente entre las muestras y el control y entre cada muestra de 24 horas con su correspondiente de 96 horas, excluyendo un análisis comparativo entre las diferentes muestras ya que esto ya se realizó anteriormente.

Los resultados se muestran en el Gráfico 10.

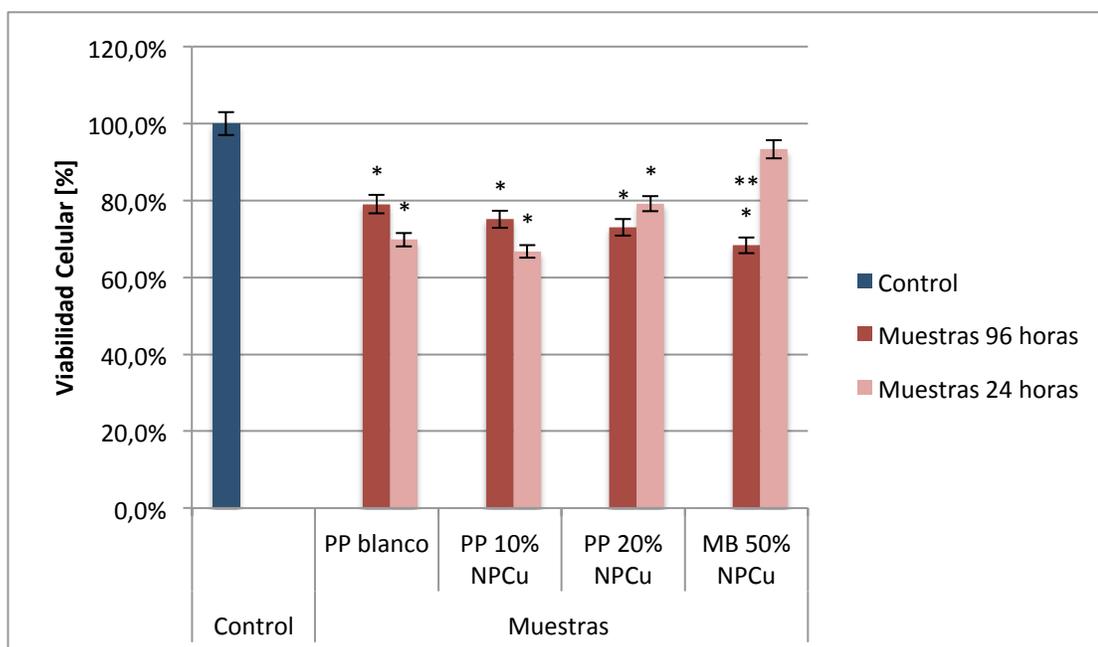


Gráfico 10. Viabilidad celular de los cultivos de CNh en presencia de los compósitos de polipropileno por 24 y 96 horas. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): p<0.01 comparado con el control, (): p<0.01 comparado con la muestra de 24 horas de masterbatch con 50% NPCu.**

En el Gráfico 10 se puede observar que los cultivos de células en presencia de las muestras de polipropileno blanco, polipropileno con 10% y 20% de NPCu alcanzan una viabilidad celular similar, sin diferencias significativas al caso en que la incubación duró solo 24 horas.

Si se observa ahora la última muestra, correspondiente al masterbatch con 50% de NPCu y se compara con la del ensayo de 24 horas se puede decir que la viabilidad celular disminuye mucho entre la muestra de 24 horas y la muestra de 96 horas. La muestra de 24 horas tiene una viabilidad celular de 93,3% y aquella de 96 horas tiene una viabilidad celular de 68,3%. Por lo tanto la muestra de polybond con 50% de nanopartículas de cobre es mas citotóxica en 96 horas y esto se debe, principalmente, a que la cantidad de iones cobre que libera en ese periodo de tiempo supera la tasa de liberación crítica, a partir de la cual el cobre liberado es tóxico para las células.

IV.4 Citotoxicidad de polipropileno con nanopartículas de cobre: Estudio sobre células tumorales endocrinas de la tiroides (UCHT1)

Para estudiar la citotoxicidad de los compósitos de polipropileno con nanopartículas de cobre se utilizaron los métodos MTT y Live/Dead explicados anteriormente. En esta sección se muestran los resultados obtenidos de citotoxicidad para células cancerígenas UCHT1.

Para ambos ensayos se utilizó el polímero funcionalizado y agregándole gelatina ya que se había comprobado que era la mejor técnica de adherencia celular para el polipropileno.

IV.4.1 Ensayo MTT

Para realizar el ensayo se subcultivaron las células sobre el polímero y se dejó en la incubadora por 24 horas.

El ensayo se realizó para polipropileno blanco y polipropileno con 10% y 20% peso peso de nanopartículas de cobre. El ensayo se realizó, también para una muestra de masterbatch pura (50% de polybond, 50% de nanopartículas de cobre).

Los resultados de citotoxicidad se muestran en el Gráfico 11. Para mayor detalle sobre los resultados ver la Tabla 23 que se adjunta anexo VII.5.

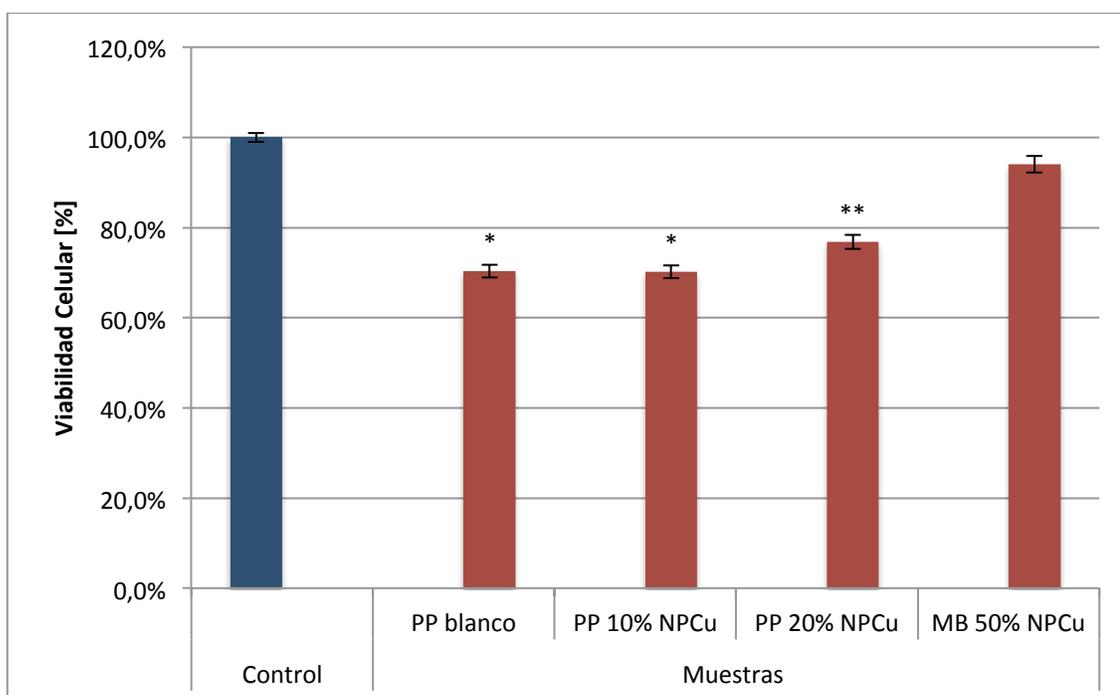


Gráfico 11. Viabilidad celular de los cultivos de UCHT1 en presencia del polipropileno con nanopartículas de cobre. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): $p < 0.01$ comparado con el control y con la muestra de MB con 50% de NPCu, (): $p < 0.01$ comparado con el control y $p < 0.05$ comparado con la muestra de MB con 50% de NPCu.**

En el Gráfico 11 se observa que hay una diferencia entre el control y las muestras de polipropileno. Esta diferencia se debe, como se dijo anteriormente, a la baja adherencia celular que tiene la superficie del polipropileno por ser apolar.

Se puede observar que no hay toxicidad manifiesta del cobre comparando la muestra de polipropileno blanco con las muestras de polipropileno con 10% p/p de nanopartículas de cobre y con 20% p/p de nanopartículas de cobre. Las tres muestras

alcanzan un valor aproximado de viabilidad celular del 70% y no se observan diferencias significativas entre ellas. Si bien existe un leve aumento entre la viabilidad celular de cultivo con la muestra de polipropileno con 20% de NPCu con respecto a aquella del cultivo con la muestra de polipropileno blanco, este se explica por el error asociado a los datos experimentales.

En cuanto a la última muestra, que corresponde a una muestra de masterbatch de polybond con 50% p/p de nanopartículas de cobre, se puede observar que se obtiene una mayor viabilidad celular del cultivo, con respecto a las muestras de polipropileno, alcanzando alrededor de un 90%. Esto se debe probablemente a la composición de esta muestra que tiene polybond puro en vez de una mezcla de polipropileno con polybond. El alto porcentaje de viabilidad celular se explica por la estructura del polybond.

IV.4.1.1 Comparación de citotoxicidad de las muestras de polipropileno sobre células CNh y UCHT1

En esta sección se compara, en las mismas condiciones, la citotoxicidad de los compósitos de polipropileno para las dos líneas celulares estudiadas (CNh y UCHT1). Para esto se comparan los resultados expuestos en el Gráfico 11 con aquellos de las muestras de polipropileno funcionalizado con gelatina expuestos en el Gráfico 6.

El análisis de Tukey, en este caso, se realizó solamente entre las muestras y el control y entre cada muestra evaluada para la línea celular UCHT1 con su correspondiente evaluada para la línea celular CNh, excluyendo un análisis comparativo entre las diferentes muestras ya que esto ya se realizó anteriormente.

Los resultados se muestran en el Gráfico 12.

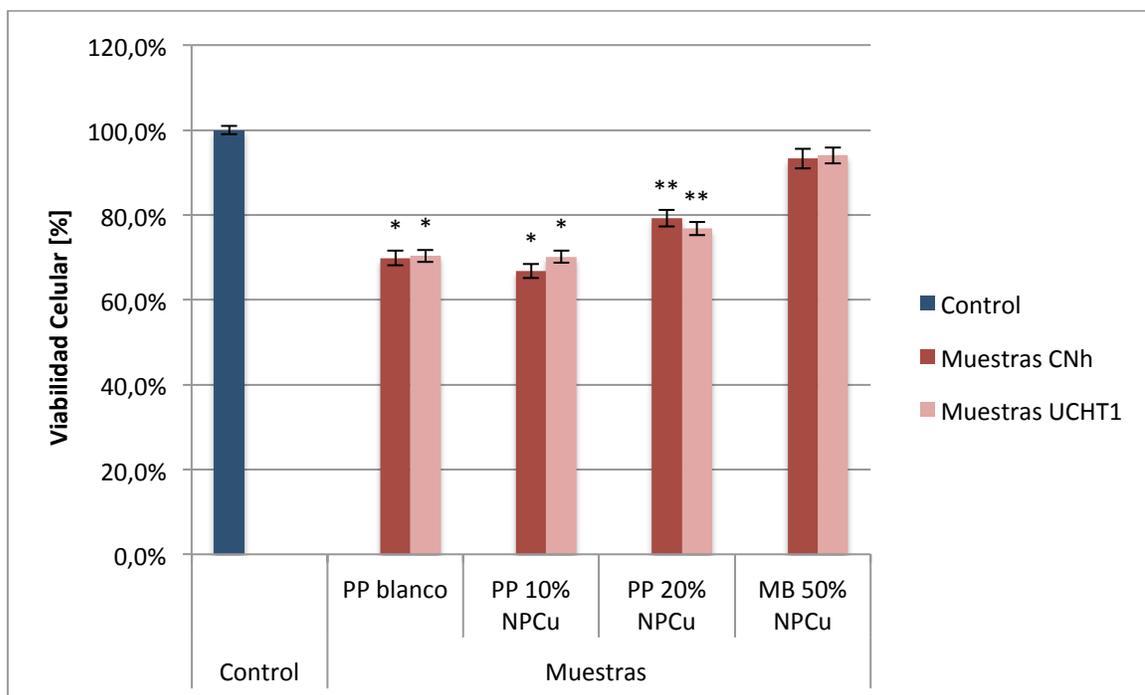


Gráfico 12. Viabilidad celular de diferentes cultivos celulares (CNh y UCHT1) en presencia del polipropileno con nanopartículas de cobre. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): p<0.01 comparado con el control, (): p<0.05 comparado con el control.**

Se puede observar que no hay diferencias significativas entre la viabilidad celular de los cultivos de CNh y UCHT1 en presencia del polipropileno con nanopartículas de cobre. Es decir que estos compósitos de polipropileno son igualmente citotóxicos para las líneas celulares CNh y UCHT1.

IV.4.2 Ensayo Live/Dead

Para realizar el ensayo se subcultivaron las células UCHT1 sobre el polímero y se dejó en la incubadora por 24 horas al igual que para el ensayo MTT. Luego del cultivo, los reactivos del ensayo estuvieron en contacto con las células por 30-45 minutos aproximadamente.

Se retiran los discos poliméricos de la placa de cultivo y se ponen en porta-objetos de tal forma que las células adheridas al polímero queden hacia abajo.

Los resultados se observaron en el microscopio de fluorescencia y, una vez obtenidas las imágenes, las células se contaron con el programa Image J.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 27.

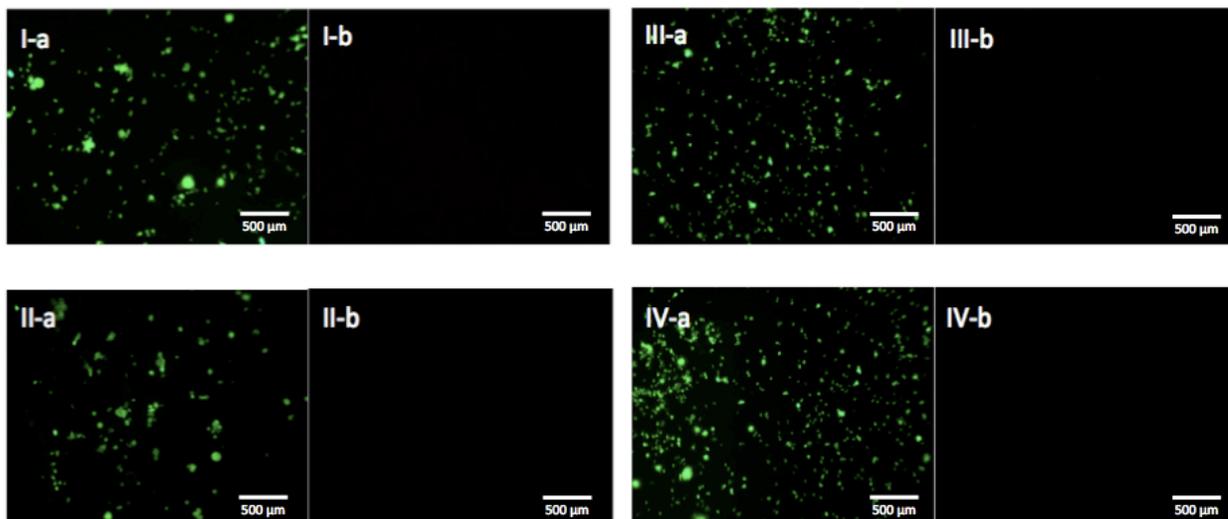


Figura 27. Imágenes de Microscopio de Fluorescencia del ensayo Live/Dead para células UCHT1 para (I) Polipropileno Blanco, (II) Polipropileno con 10% de NPCu, (III) Polipropileno con 20% de NPCu, (IV) Polybond con 50% de NPCu. a- Fluorescencia Verde para células vivas; b- Fluorescencia Roja para células muertas.

En la Figura 27 se confirma que hay células vivas UCHT1 que se están adhiriendo al polímero por la cantidad de células fluorescentes verdes observadas en las imágenes de la Figura 26.

A partir de las imágenes, se puede decir que, al igual que para las células CNh, no hay citotoxicidad relativa a las nanopartículas de cobre para esta línea celular. Esto ya que no se observan mayores diferencias entre la imagen de células vivas correspondientes al polímero blanco (I-a) y las imágenes de células vivas correspondientes a los polímeros de polipropileno con 10% y 20% de NPCu (II-a y III-a).

Se observa una mayor cantidad de células fluorescentes verdes en la imagen IV-a correspondiente a la muestra de polybond con 50% de nanopartículas de cobre. Esto confirma la buena adherencia celular de la matriz de polybond por las características de su estructura que ya se analizaron.

Se contaron las células vivas en cada caso con el programa Image J y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 11. Para todos los casos se realizó un promedio entre 4 imágenes de fluorescencia de la muestra para tener un resultado más significativo de toda la muestra polimérica.

Tabla 11. Resultado ensayo Live/Dead para el polipropileno con nanopartículas de cobre para células UCHT1.

	PP0320 Blanco	PP0320 10% NPCu	PP0320 20% NPCu	Masterbatch 50% NPCu
Células Vivas	146 ± 9,1	133 ± 10,7	165 ± 16,9	213 ± 8,8
Células Muertas	0	0	0	0

La Tabla 11 confirma que no hay mayores diferencias entre el número de células vivas adheridas a las muestras de polipropileno blanco, con 10% y 20% p/p de nanopartículas de cobre.

El número de células vivas adheridas a la superficie se ve notablemente incrementado para la muestra de masterbatch de polybond con 50% p/p de nanopartículas de cobre. Este resultado ratifica lo observado en la imagen de fluorescencia y la buena adherencia del polybond.

IV.5 Citotoxicidad del polipropileno con nanopartículas de cobre en un periodo de tiempo más prolongado (96 horas): Estudio sobre células tumorales endocrinas de la tiroides (UCHT1)

Se realizó un ensayo para verificar si el tiempo en contacto con el compósito polimérico es un factor significativo de citotoxicidad. Esto ya que se sabe que en mayor tiempo, el compósito polimérico debiera liberar una mayor cantidad de iones cobre.

Para esto, se preparó la placa con las muestras poliméricas y el medio de cultivo y se dejó en la incubadora. Luego de 72 horas en la incubadora, se retiró la placa y se subcultivaron las células UCHT1 sobre el polímero. Se dejó la placa de cultivo en la incubadora por 24 horas más. Las muestras poliméricas evaluadas fueron previamente funcionalizadas y se les agregó gelatina para mejorar la adherencia del polipropileno.

Se utilizó, en este caso, el ensayo MTT para evaluar la citotoxicidad de los compósitos. Los resultados se muestran en el Gráfico 13. Para mayor detalle sobre los resultados ver la Tabla 24 que se adjunta anexo VII.6.

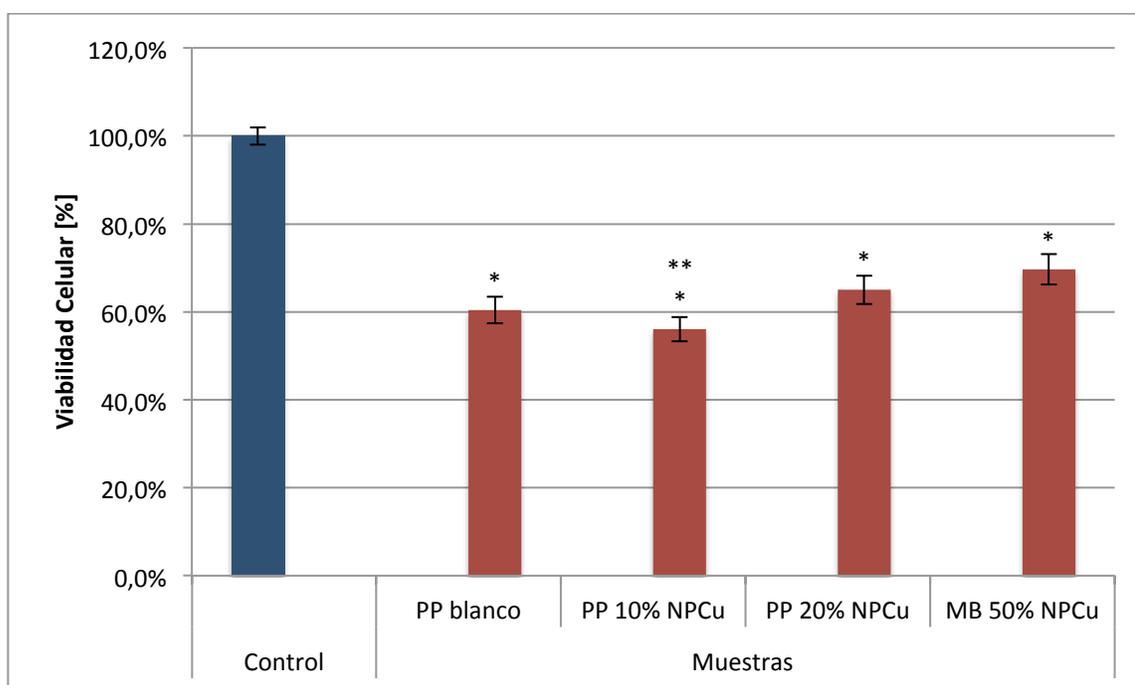


Gráfico 13. Viabilidad celular de los cultivos de UCHT1 en presencia del polipropileno con NPCu por 96 horas. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): p<0.01 comparado con el control, (): p<0.01 comparado con la muestra de MB con 50% de NPCu.**

En el Gráfico 13 se pueden observar leves diferencias entre la muestra de polipropileno blanco y las muestras con nanopartículas de cobre. Sin embargo estas diferencias no son significativas, excepto en el caso de la muestra de polipropileno con 10% de NPCu con la muestra de masterbatch con 50% de NPCu, como para apreciar una real citotoxicidad de las nanopartículas de cobre en estas condiciones, es más, algunas de

las muestras (PP con 20% de NPCu y MB con 50% de NPCu) exhiben una viabilidad celular del cultivo un poco mayor que la muestra de polipropileno blanco.

La diferencia observada entre la muestra de masterbatch con 50% de NPCu y el resto de las muestras, que en realidad es solo significativa con la muestra de polipropileno con 10% de NPCu, se debe a la matriz de esta muestra, el polybond, que como se explicó anteriormente es polipropileno modificado con anhídrido maleico y, por lo tanto, más polar que el polipropileno puro.

IV.5.1 Comparación de citotoxicidad de las muestras de polipropileno sobre células UCHT1 en 24 horas y en 96 horas

En esta sección se busca comparar los resultados de citotoxicidad obtenidos, sobre células UCHT1, con un tiempo de exposición de 24 horas y aquellos obtenidos con un tiempo más prolongado de 96 horas. Para esto se compara el Gráfico 13 con el Gráfico 11 de viabilidad celular de los Polímeros sobre células UCHT1 en 24 horas.

El análisis de Tukey, en este caso, se realizó solamente entre las muestras y el control y entre cada muestra de 24 horas con su correspondiente de 96 horas, excluyendo un análisis comparativo entre las diferentes muestras ya que esto ya se realizó anteriormente.

Los resultados se muestran en el Gráfico 14.

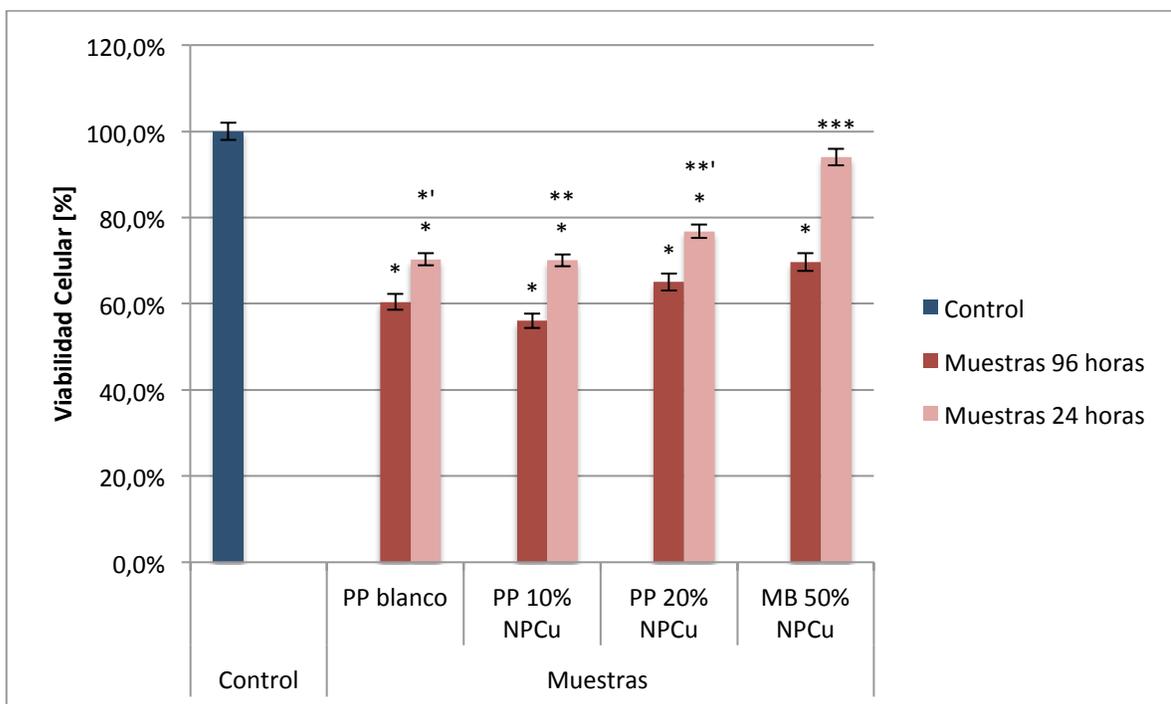


Gráfico 14. Viabilidad celular de los cultivos de UCHT1 en presencia de los compósitos de polipropileno por 24 y 96 horas. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): $p < 0.01$ comparado con el control, (**): $p < 0,05$ comparado con la muestra de 96 horas de PP blanco, (**'): $p < 0.01$ comparado con la muestra de 96 horas de PP con 10% de NPCu, (**): $p < 0.01$ comparado con la muestra de 96 horas de PP con 20% de NPCu, (**'): $p < 0.01$ comparado con la muestra de 96 horas de MB con 50% de NPCu.

En el Gráfico 14 se puede observar que las muestras de 96 horas de polipropileno blanco, polipropileno con 10% y 20% de NPCu alcanzan una viabilidad celular del cultivo un poco menor que en el caso en que la incubación duró 24 horas. La diferencia es del orden del 10%.

Si se observa ahora la última muestra de 96 horas, correspondiente al masterbatch con 50% de NPCu y se compara con la del ensayo de 24 horas se puede decir que la viabilidad celular del cultivo disminuye mucho entre la muestra de 24 horas y la muestra de 96 horas. La muestra de 24 horas tiene una viabilidad celular de 94% y aquella de 96 horas tiene una viabilidad celular de 69,7%. Por lo tanto la muestra de polybond con 50% de nanopartículas de cobre es mas citotóxica en 96 horas y esto se debe, principalmente, a la cantidad de iones cobre que libera en ese periodo de tiempo que debiese ser mayor que en 24 horas y mayor que la del resto de las muestras. Para

comprobar esta teoría se realizaron ensayos de liberación de iones cobre a todos los compósitos de polipropileno.

IV.6 Citotoxicidad del polipropileno con nanopartículas de cobre: Ensayo de liberación de iones cobre.

El ensayo de liberación de iones cobre para los compósitos de polipropileno se realizó en el transcurso de 4 días. Se realizaron tres mediciones cada 2 horas el primer día, una medición a las 24 horas y una a las 96 horas.

Es importante destacar que este ensayo representa los [mg] de iones cobre liberados por [cm²] de polímero en 1 [L] de agua desionizada para cada caso. En los cultivos celulares de este trabajo se utilizó una disco polimérico de 19,6 [mm²] en 150 [μl] de medio de cultivo.

Los resultados obtenidos se muestran en el Gráfico 15. Para mayor detalle sobre los resultados ver la Tabla 25 que se adjunta anexo VII.7.

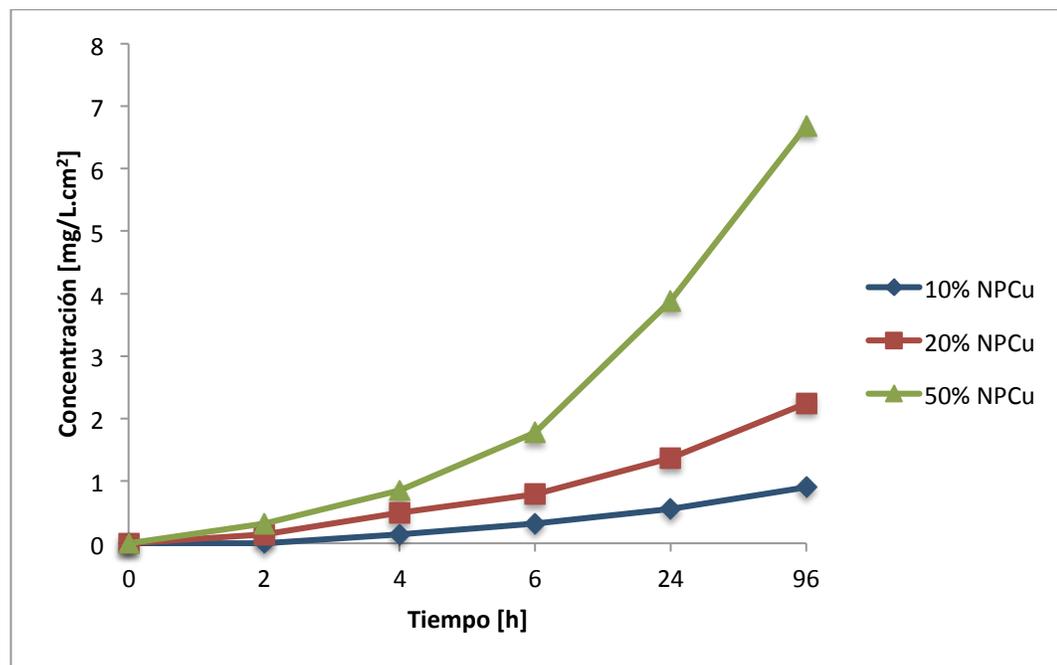


Gráfico 15. Lixiviación de iones cobre de los compósitos de polipropileno con 10% y 20% de NPCu y polybond con 50% de NPCu.

En el Gráfico 15 se puede observar que la muestra de polybond con 50% de NPCu tiene la mejor liberación de iones, le sigue la muestra de polipropileno con 20% de NPCu y finalmente la muestra de polipropileno con 10% de NPCu. Estos resultados muestran que mientras mayor es el porcentaje de nanopartículas de cobre en el polímero mayor es la cantidad de iones cobre liberada. Además la cantidad de iones cobre aumenta a lo largo del tiempo para todas las muestras poliméricas.

Este gráfico de lixiviación junto con los resultados anteriores de citotoxicidad de la muestra de masterbatch con 50% de NPCu en 96 horas indican una concentración de iones cobre que sería tóxica para las células. Para deducir esta concentración inocua límite, a partir de la cual el cobre estaría matando a las células, se estudiará, particularmente, la liberación de iones cobre de cada disco de polipropileno, muestra utilizada para los ensayos de citotoxicidad.

Del ensayo de lixiviación se deduce la Tabla 12, que muestra el cobre liberado por cada uno de los discos de 19,6 mm² de polipropileno utilizados en los ensayos de citotoxicidad.

Tabla 12. Cantidad de NPCu en los discos y concentración de iones cobre liberada cada uno de los discos de polipropileno en agua destilada.

	Cantidad de NPCu [mg]	Iones Cobre liberados por el compósito [mg/L]	
		24 horas	96 horas
PP con 10% NPCu	4,8	0,1	0,18
PP con 20% NPCu	10,6	0,27	0,44
MB con 50% NPCu	40	0,76	1,31

En la Tabla 12 se observa que, pese a contener una cantidad considerable de nanopartículas de cobre, los compósitos de polipropileno tienen una baja liberación de iones cobre. Por lo tanto, se puede, con este tipo de compósitos, controlar la lixiviación de iones cobre y mantenerla por un tiempo más prolongado.

Se discutió anteriormente que los compósitos de polipropileno y polybond estudiados no son citotóxicos en 24 horas. En 96 horas, la única muestra citotóxica es el masterbatch con 50% de NPCu por lo tanto se deduce que una concentración de 0,76 [mg/L] no es tóxica para las células ya que corresponde a lo liberado por el masterbatch con 50% de NPCu en 24 horas. En cambio, el cobre liberado por el masterbatch con 50% de NPCu en 96 horas si sería tóxica para estas, es decir, 1,31 [mg/L] de cobre. Por lo tanto la concentración límite de cobre que no es citotóxica para este tipo de células se encuentra en el intervalo [0,76; 1,31] [mg/L]. Es importante recordar que los estudios de lixiviación de iones cobre de los compósitos se realizaron en agua por lo que este valor podría ser un poco diferente al realizar estos estudios en medio de cultivo.

IV.7 Citotoxicidad de compósitos de alginato con nanopartículas de cobre: Estudio sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh)

Para estudiar la citotoxicidad de los compósitos de alginato con nanopartículas de cobre se utilizó el método MTT. En esta sección se analiza la síntesis de alginato en el laboratorio de Polímeros de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Chile y se muestran los resultados obtenidos de citotoxicidad para células CNh.

IV.7.1 Desarrollo de compósitos de Alginato

Se desarrollaron hidrogeles esféricos de alginato para los ensayos de citotoxicidad. Se desarrollaron compósitos de alginato puro, con 1%, 3%, 5%, 8% y con 10% de NPCu. Algunos de estos compósitos se pueden observar en la Figura 28.

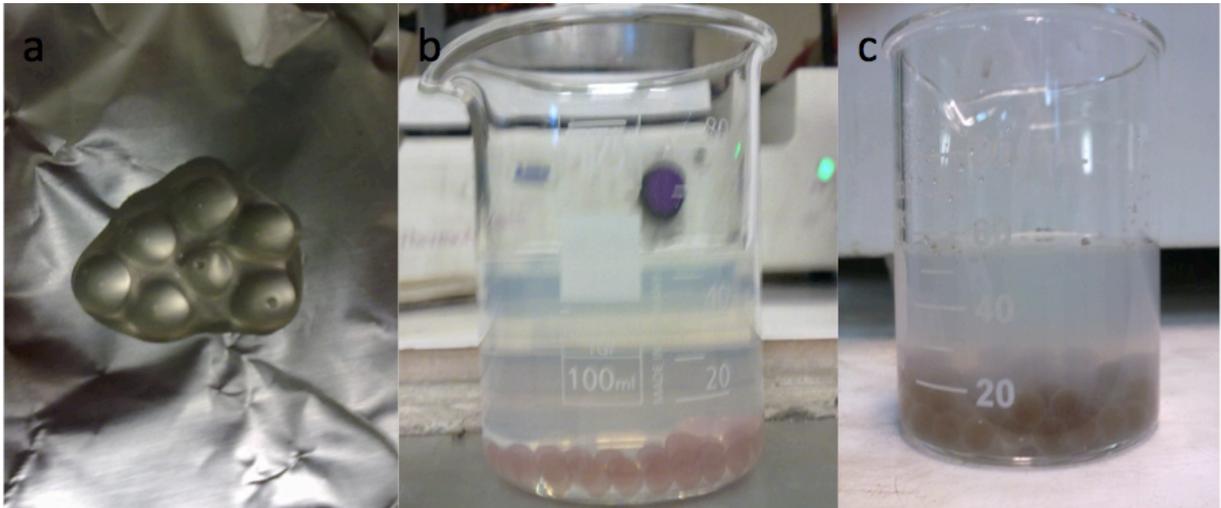


Figura 28. Compósitos desarrollados de (a) alginato puro, (b) alginato con 5% de NPCu, (c) alginato con 10% de NPCu (Diámetro de la esfera: 6 mm aproximadamente).

IV.7.2 Ensayo MTT

Para realizar el ensayo se subcultivaron las células sobre la esfera de alginato y se dejó en incubadora por 24 horas. El ensayo se realizó para alginato blanco y mezclado con 1%, 3%, 5%, 8% y 10% p/p de nanopartículas de cobre.

Los resultados de citotoxicidad se muestran en el Gráfico 16. Para mayor detalle sobre los resultados ver la Tabla 26 que se adjunta anexo VII.8.

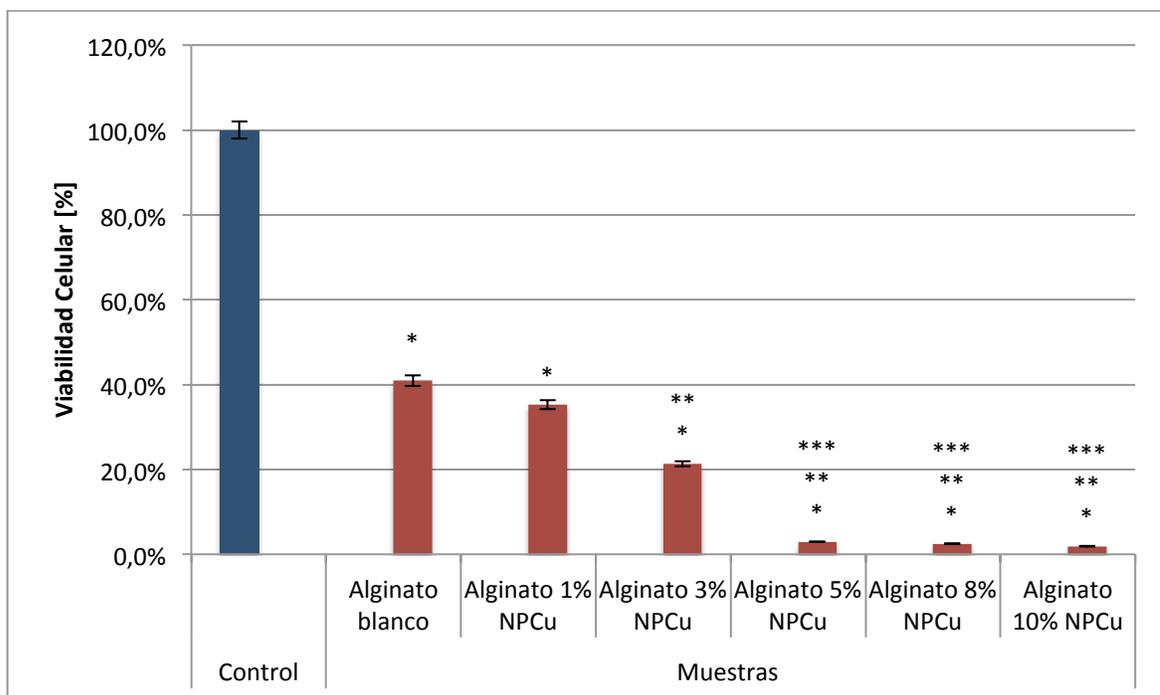


Gráfico 16. Viabilidad celular de los cultivos de CNh en presencia del alginato con nanopartículas de cobre.

Datos = Promedio + SD; n=6; (*): $p < 0.01$ comparado con el control, **(**)**: $p < 0.01$ comparado con la muestra alginato blanco, **(***)**: $p < 0.01$ comparado con la muestra de alginato con 1% de NPCu y $p < 0.05$ comparado con la muestra de alginato con 3% de NPCu.

En el Gráfico 16 se puede observar que los cultivos en presencia de las esferas de alginato, incluyendo la esfera de alginato sin nanopartículas de cobre, tienen una viabilidad celular muy baja. Se plantean dos explicaciones para este suceso y se evaluarán ambas alternativas:

- El alginato está fabricado a partir de cloruro de bario que podría estar siendo tóxico para las células.
- Hay una diferencia de osmolaridad significativa entre el agua destilada, con la que se desarrolla la solución de alginato, y el medio de cultivo. Una opción viable sería utilizar PBS en lugar de agua destilada para preparar la solución de alginato.

Al comparar la viabilidad celular de los cultivos en presencia de las esferas de alginato entre ellas, se observa que comienza a disminuir drásticamente a partir de la muestra de alginato con 1% de nanopartículas de cobre. Por lo tanto, para los compósitos de alginato, un 1% de nanopartículas de cobre es una concentración de cobre inocua para las células estudiadas, en cambio, un 3% de nanopartículas de cobre es una concentración citotóxica. Esto se debe a que el alginato libera más fácilmente el cobre que contiene, en comparación con el polipropileno por ejemplo, por tratarse de un hidrogel. Se corroborará este resultado con los ensayos de lixiviación que se realizaron a las muestras de alginato.

IV.8 Citotoxicidad de compósitos de alginato con nanopartículas de cobre: Estudio sobre células tumorales endocrinas de la tiroides (UCHT1)

Para estudiar la citotoxicidad de los compósitos de alginato con nanopartículas de cobre se utilizó el método MTT. En esta sección se muestran los resultados obtenidos de citotoxicidad para células cancerígenas UCHT1.

Para realizar el ensayo se subcultivaron las células sobre la esfera de alginato y se dejó en incubadora por 24 horas. El ensayo se realizó para alginato blanco y mezclado con 1%, 3%, 5%, 8% y 10% p/p de masterbatch de polybond con nanopartículas de cobre.

Los resultados de citotoxicidad se muestran en el Gráfico 17. Para mayor detalle sobre los resultados ver la Tabla 27 que se adjunta anexo VII.9.

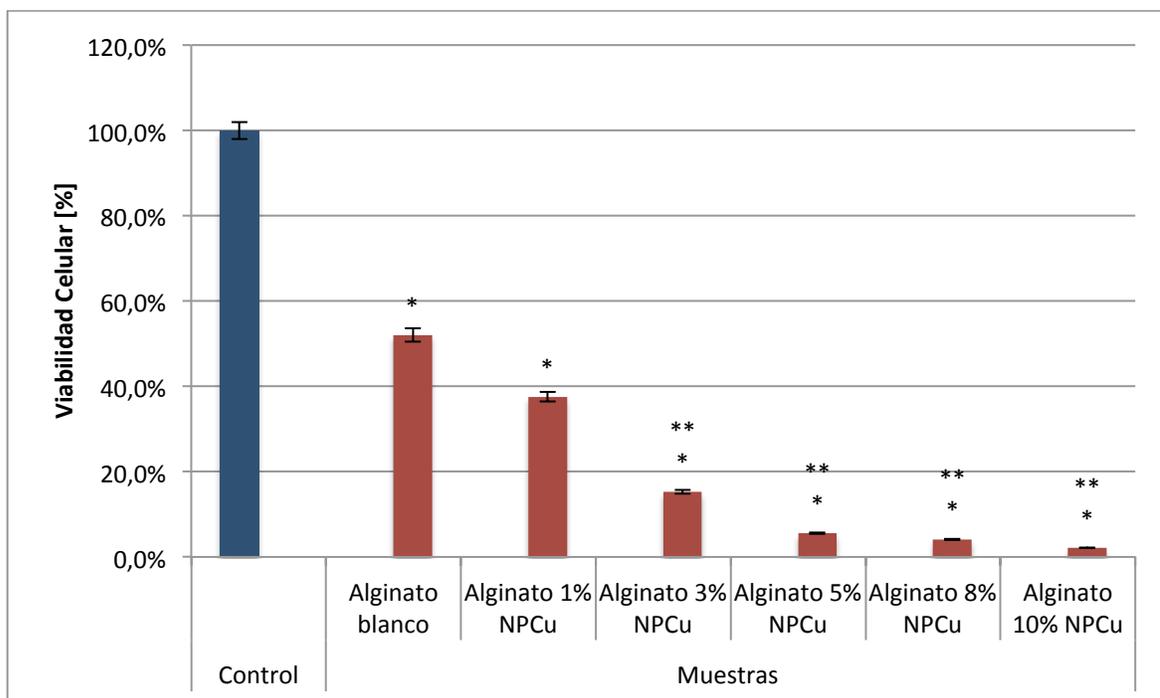


Gráfico 17. Viabilidad celular de los cultivos de UCHT1 en presencia del alginato con nanopartículas de cobre. Datos = Promedio + SD; n=6; (*) p<0.01 comparado con el control, () p<0.01 comparado con la muestra alginato blanco y con la muestra de alginato con 1% de NPCu.**

En el Gráfico 17 se puede observar que los cultivos de UCHT1 en presencia de las muestras de alginato tienen una viabilidad celular muy baja al igual que para el caso de células de corteza cerebral de ratón normal (CNh). Esto se puede deber a la forma de fabricación de las esferas a partir de cloruro de bario ya que este último puede estar siendo tóxico para las células.

IV.8.1 Comparación de citotoxicidad de las muestras de alginato sobre células CNh y UCHT1

Los resultados de citotoxicidad obtenidos para células cancerígenas UCHT1 son muy semejantes a aquellos obtenidos para células CNh. La comparación de la citotoxicidad de los compósitos de alginatos para ambos tipos de células se puede observar en el Gráfico 18.

El análisis de Tukey, en este caso, se realizó solamente entre las muestras y el control y entre cada muestra evaluada para la línea celular UCHT1 con su correspondiente

evaluada para la línea celular CNh, excluyendo un análisis comparativo entre las diferentes muestras ya que esto ya se realizó anteriormente.

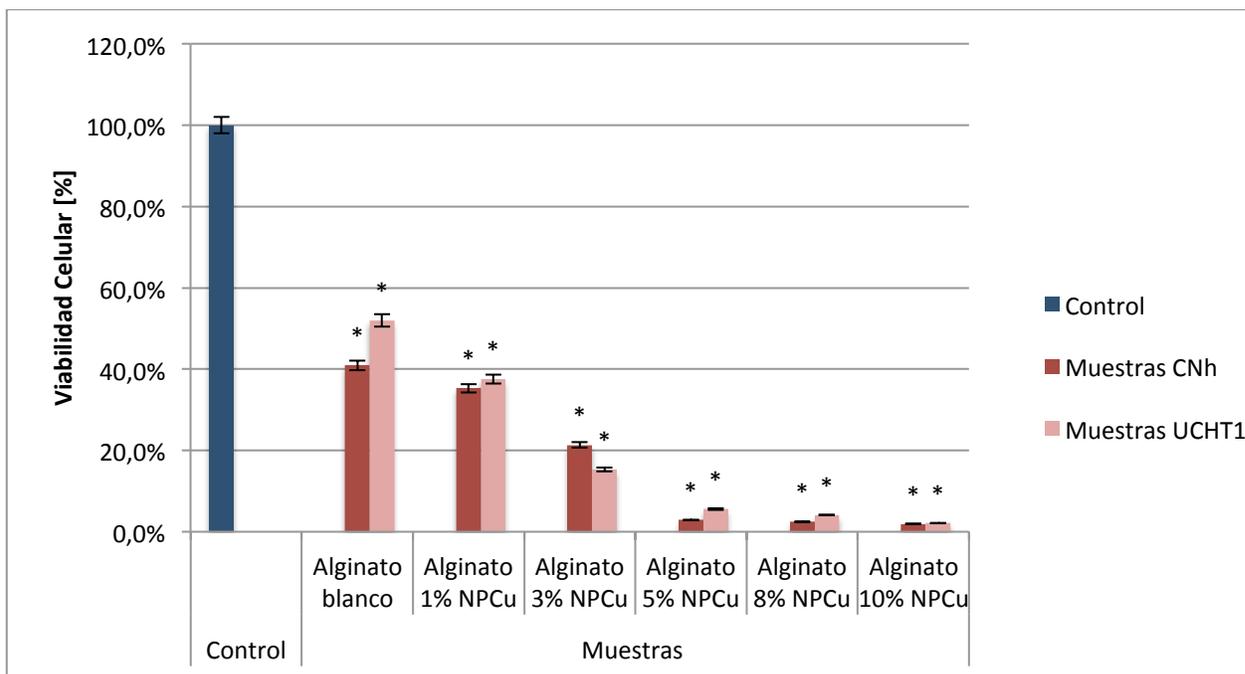


Gráfico 18. Viabilidad celular de diferentes cultivos celulares (CNh y UCHT1) en presencia del alginato con nanopartículas de cobre. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): $p < 0,01$ comparado con el control.

Se puede observar que, pese a que no alcanzan el mismo porcentaje de viabilidad celular en cada caso, no hay diferencias significativas entre la viabilidad celular de los cultivos de CNh y UCHT1 en presencia del alginato con nanopartículas de cobre. Es decir que estos compósitos de alginato son igualmente citotóxicos para células CNh que para células UCHT1.

La mayor diferencia, que aún así no es significativa, se observa para la muestra de alginato blanco donde, al realizar el ensayo sobre células UCHT1 se observa una viabilidad celular mayor que al realizar el mismo ensayo sobre células CNh. Esta diferencia se debe a la mayor resistencia que tienen las células UCHT1 por sobre las células CNh por tratarse de una línea celular cancerígena.

IV.9 Citotoxicidad del cloruro de bario y alginato puro: Estudio sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh)

Se realizó el ensayo MTT para evaluar la citotoxicidad de algunos componentes de las esferas de alginato: el cloruro de bario y el alginato en polvo. Esto para ver si estos componentes son tóxicos de por sí para células y así explicar la baja viabilidad celular del cultivo en presencia de las muestras esféricas de alginato.

Se evaluó la citotoxicidad del cloruro de bario a una concentración de 20 [mM], que fue la utilizada en la fabricación de las esferas de alginato. Se evaluó la citotoxicidad de 0,003 [gr] de alginato en 150 [μl] de medio de cultivo para obtener una concentración de alginato al 2%, que fue la utilizada en la fabricación de las esferas de alginato.

Los resultados se muestran en el Gráfico 19.

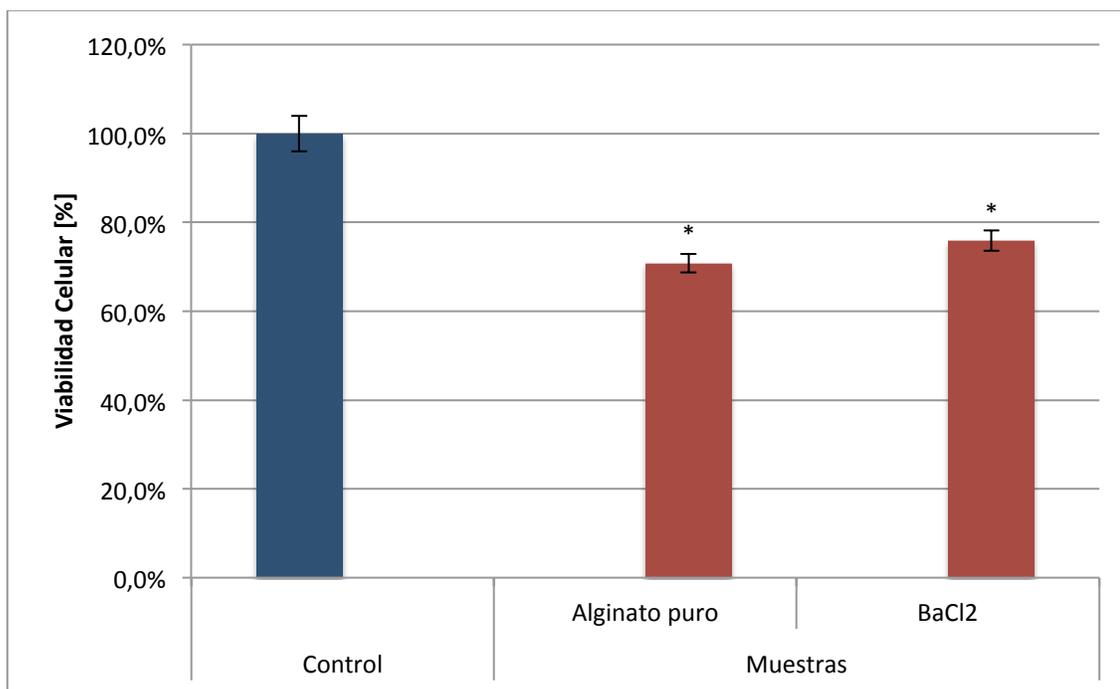


Gráfico 19. Citotoxicidad del alginato puro y el cloruro de bario. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): $p < 0.01$ comparado con el control.

En el Gráfico 19 se puede observar que el alginato puro y el cloruro de bario son muy poco tóxicos, en las concentraciones usadas para preparar los compósitos de alginato, para las células.

La viabilidad celular de los cultivos en presencia de estos compuestos no es de 100% pero sí bastante alta por lo tanto no son los principales causantes de la baja viabilidad celular observada para los compósitos de alginato. Sin embargo, pese a la alta viabilidad celular en presencia de estos compuestos, se puede apreciar una diferencia significativa comparándola con el control por lo que se deduce que algo influyen en la toxicidad observada para los compósitos de alginato.

IV.10 Citotoxicidad de compósitos de alginato con nanopartículas de cobre preparados en una solución de PBS: Estudio sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh)

Se realizó un ensayo para verificar si la diferencia de osmolaridad entre el agua destilada y el medio de cultivo, donde se realizan los ensayos, está afectando en la baja viabilidad celular de los cultivos en presencia de los compósitos de alginato. Para esto se preparó la solución de alginato en PBS en lugar de agua destilada.

Para estudiar la citotoxicidad de estos compósitos de alginato con nanopartículas de cobre se utilizó el método MTT.

Los resultados se muestran a continuación:

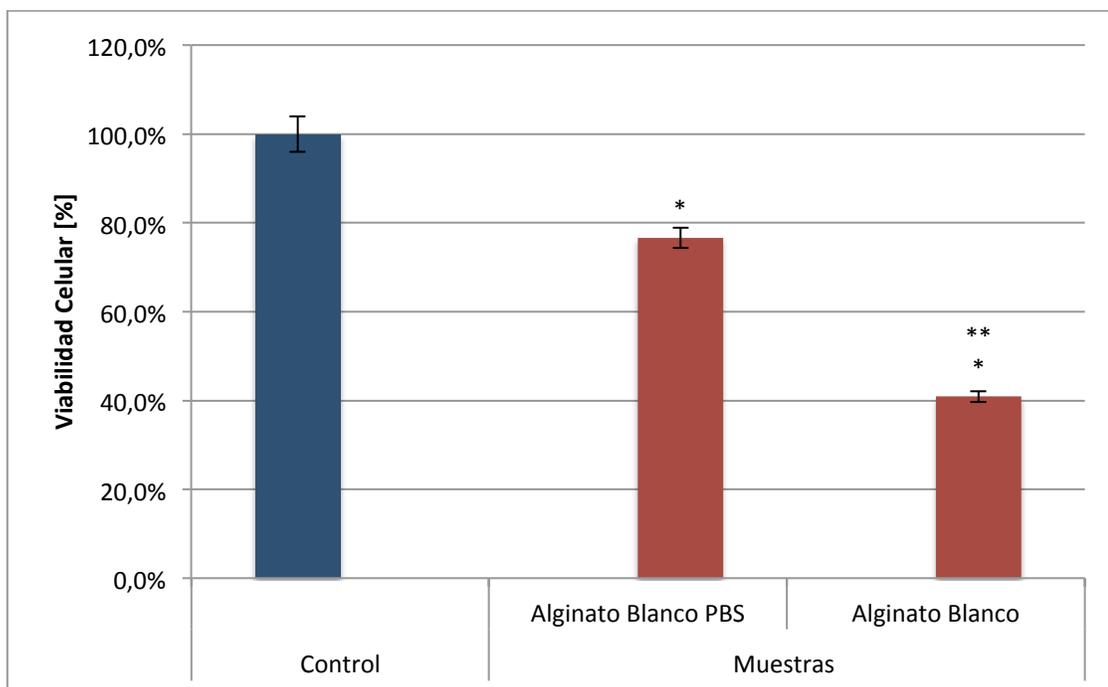


Gráfico 20. Comparación de la viabilidad celular de los cultivos de CNh en presencia de compósitos de alginato blanco preparados con agua destilada y PBS. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): p<0.01 comparado con el control, (): p<0.01 comparado con el compósito de alginato blanco preparado con PBS.**

En el Gráfico 20 se puede observar que la viabilidad celular aumenta considerablemente (de 40,9% a 76,7%) al preparar la solución de alginato con PBS en vez de agua destilada. Esto se debe a que la diferencia de osmolaridad entre el medio de cultivo y el PBS es mucho menor que la diferencia de osmolaridad entre el medio de cultivo y el agua destilada. Esta diferencia de osmolaridad provoca un medio celular hipotónico, es decir que la concentración de soluto es menor en el medio que en el interior de la célula. En un medio hipotónico, la célula absorbe agua hinchándose hasta el punto en que puede estallar dando origen a la citólisis, es decir, la rotura de la célula y pérdida de su material genético y vitalidad.

Por lo tanto, la utilización de agua destilada en lugar de PBS para preparar los compósitos de alginato es la principal razón de la baja viabilidad celular observada para estos compósitos en el Gráfico 16. Se recomienda, para futuros estudios, utilizar PBS para la preparación de alginato.

IV.11 Citotoxicidad del alginato con nanopartículas de cobre: Ensayo de liberación de iones cobre.

El ensayo de liberación de iones cobre para los compósitos de alginato se realizó en el transcurso de 4 días. Se realizaron tres mediciones cada 2 horas el primer día, una medición a las 24 horas y una a las 96 horas.

Es importante destacar que este ensayo representa los iones cobre liberados por 20 esferas de alginato (aproximadamente 1 [gr]) en 1 [L] de agua desionizada para cada caso. En los cultivos celulares de este trabajo se utilizó una esfera de alginato en 150 [μl] de medio de cultivo.

Los resultados se pueden observar en el Gráfico 21. Para mayor detalle sobre los resultados ver la Tabla 28 que se adjunta anexo VII.10.

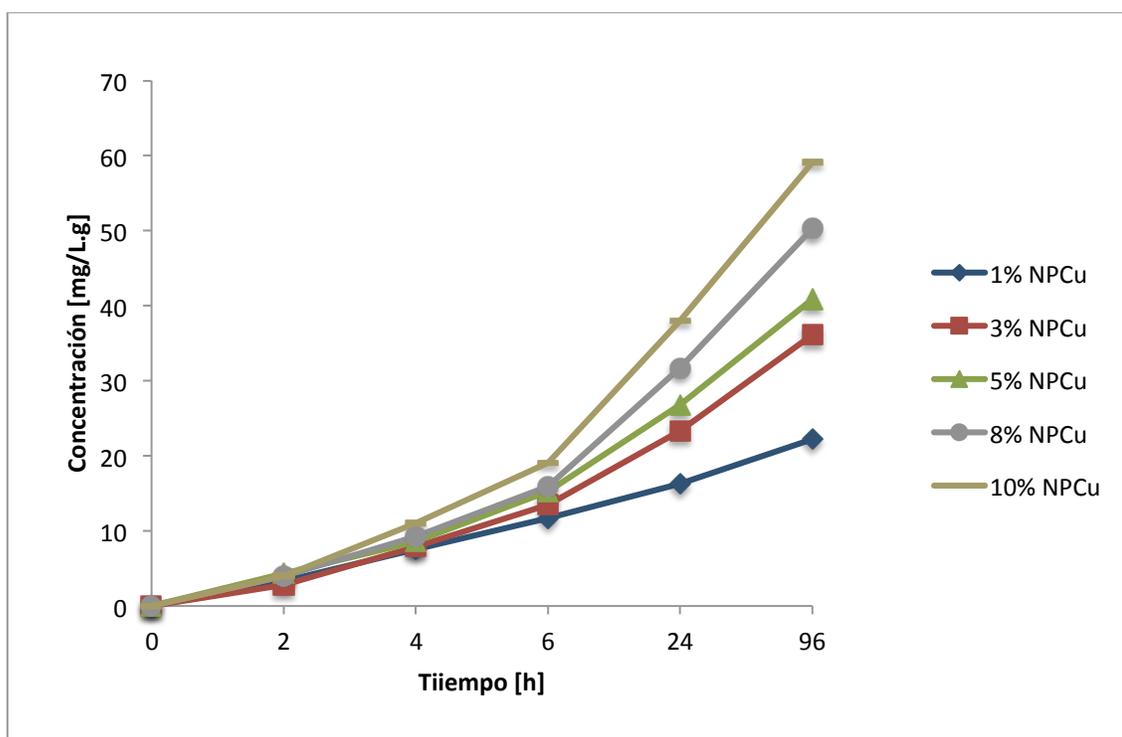


Gráfico 21. Lixiviación de iones cobre de los compósitos de alginato con 1%, 3%, 5%, 8% y 10% de NPCu.

En el Gráfico 21 se puede observar que la muestra de alginato con 10% de NPCu es la que tiene mejor liberación de iones, le siguen las muestras de alginato con 8%, 5% y

3% de NPCu y finalmente la muestra de alginato con 1% de NPCu. Estos resultados muestran que mientras mayor es el porcentaje de nanopartículas de cobre en el polímero de alginato mayor es la cantidad de iones cobre liberada. Además la cantidad de iones cobre aumenta a lo largo del tiempo para todas las muestras poliméricas.

Este gráfico de lixiviación junto con los resultados anteriores de citotoxicidad de los compósitos de alginato tanto para células CNh como para células UCHT1 indican una concentración de iones cobre que sería tóxica para las células. Para deducir esta concentración inocua límite, a partir de la cual el cobre estaría matando a las células, se estudiará, particularmente, la liberación de iones cobre de cada esfera de alginato, muestra utilizada para los ensayos de citotoxicidad.

Del ensayo de lixiviación se deduce la tabla del cobre liberado por cada una de las esferas de alginato utilizadas en los ensayos de citotoxicidad.

Tabla 13. Cantidad de NPCu en las esferas y concentración de iones cobre liberada por cada una de las esferas de alginato en agua destilada.

	Cantidad de NPCu [mg]	Cobre liberado por el compósito [mg/L]	
		24 horas	96 horas
1% NPCu	0,24	0,42	0,60
3% NPCu	0,72	1,10	1,68
5% NPCu	1,2	1,34	2,04
8% NPCu	1,92	1,59	2,52
10% NPCu	2,3	1,90	2,95

En la Tabla 13 se puede observar que el cobre liberado por cada esfera de alginato es muy superior al cobre liberado por los discos de polipropileno con 10% y 20% de NPCu tanto en 24 como en 96 horas. Además se observa que, a diferencia de los compósitos de polipropileno, los compósitos de alginato tienen una alta liberación de iones cobre con respecto a la concentración de nanopartículas en las esferas. Al tratarse de un

hidrogel, el alginato libera muy fácilmente el cobre que contiene y en un tiempo mucho más acotado que el polipropileno.

Se discutió anteriormente que los compósitos de alginato son citotóxicos, en 24 horas, a partir del alginato con 3% de NPCu por lo tanto se deduce que una concentración de 1,1 [mg/L] es tóxica para las células. Esta concentración se encuentra en el intervalo establecido por los ensayos realizados con los compósitos de polipropileno y lo acota superiormente. Entonces la tasa de liberación crítica de iones de cobre, en agua, se encuentra en el intervalo [0,76; 1,1] [mg/L].

Solo a modo de comparación se conocen las dosis recomendadas y el límite máximo de cobre por día para las personas. Si se considera una persona adulta, es decir, mayor de 18 años, se recomienda una dosis de 0,90 [mg/día] de cobre y se tiene un límite máximo de 10 [mg/día de cobre]. Además se sabe que esa misma persona adulta tiene alrededor de 4-5 litros de sangre en el cuerpo. La estimación que se realizó sobre la concentración límite de cobre que no es citotóxica para células CNh y UCHT1 ([0,76; 1,1] [mg/L]) se encontraría, por lo tanto, entre estas dosis de recomendación y límite máximo establecidos para una persona adulta.

IV.12 Citotoxicidad de las nanopartículas de cobre: Estudio sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh)

Se realizó, finalmente, el estudio de la citotoxicidad de las nanopartículas de cobre comerciales para comparar los resultados con los de citotoxicidad de estas nanopartículas en los compósitos poliméricos de polipropileno y alginato.

IV.12.1 Ensayo MTT

Para estudiar la citotoxicidad de las nanopartículas de cobre se agregó, en los pocillos de cultivo, una cantidad de nanopartículas de cobre tal que cubra, con una capa delgada, la superficie del pocillo y se utilizó el método MTT.

Los resultados son los siguientes:

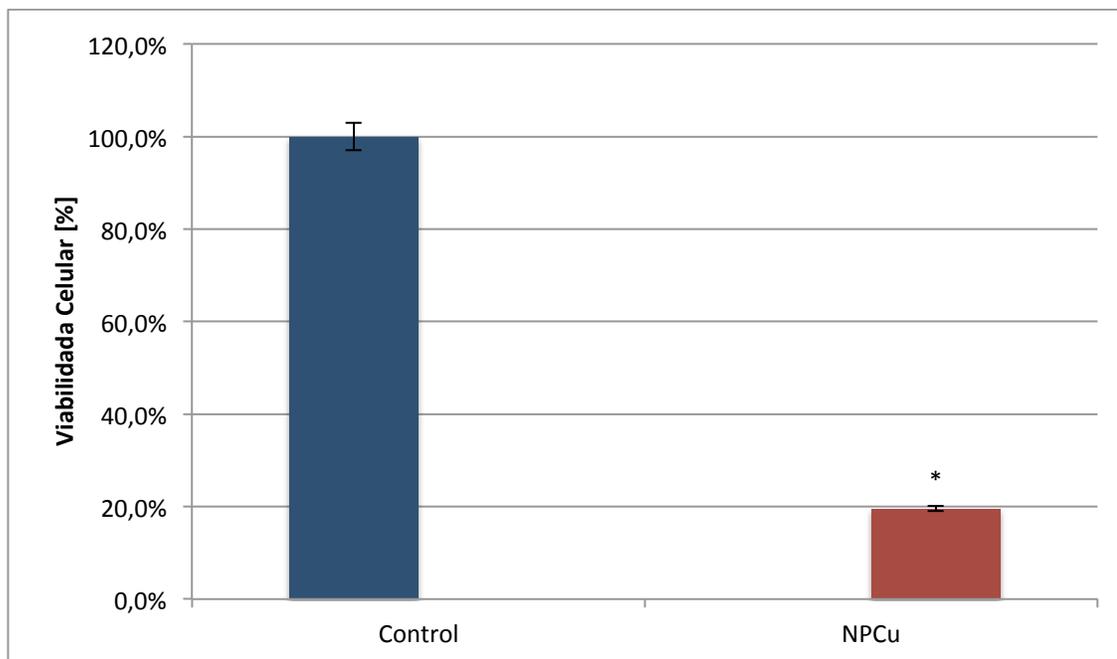


Gráfico 22. Viabilidad celular de los cultivos de CNh en presencia de las nanopartículas de cobre comerciales. Datos = Promedio + SD; n=6; (*): p<0.01 comparado con el control.

En el Gráfico 22 se puede observar que la viabilidad celular en presencia de las nanopartículas de cobre es muy baja, del orden del 20%. Es decir que las nanopartículas de cobre puras tienen una alta citotoxicidad. La cantidad de nanopartículas de cobre evaluada en este ensayo corresponde aproximadamente a 0,02 [g], una cantidad que se puede clasificar entre lo que contienen los compósitos de polipropileno con 20% de NPCu y las muestras de masterbatch con 50% de NPCu.

IV.12.2 Ensayo de liberación de iones cobre

El ensayo de liberación de iones cobre para las nanopartículas de cobre comerciales se realizó en el transcurso de 4 días. Se realizaron tres mediciones cada 2 horas el primer día, una medición a las 24 horas y una a las 96 horas.

Es importante destacar que este ensayo representa los [mg] de iones cobre liberados por [g] de nanopartículas de cobre en 1 [L] de agua desionizada para cada caso. En los cultivos celulares de este trabajo se utilizaron 0,02 [g] de nanopartículas de cobre comerciales en 150 [μl] de medio de cultivo. A modo de comparación, esta cantidad corresponde a aproximadamente la mitad de lo que contiene un disco de masterbatch con 50% de NPCu.

Los resultados se muestran en el Gráfico 23.

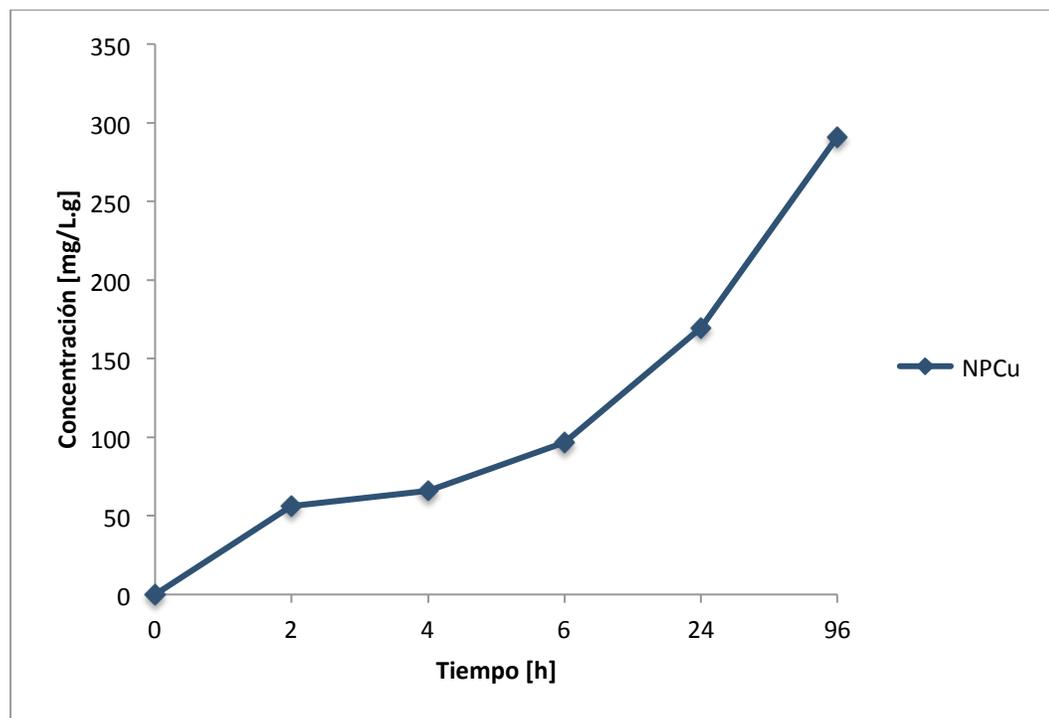


Gráfico 23. Lixiviación de iones cobre de las nanopartículas de cobre comerciales.

En el Gráfico 23 se puede observar que la liberación de iones cobre de las nanopartículas de cobre comerciales es bastante alta. Del ensayo de lixiviación se deduce la tabla del cobre liberado por 20 [mg] de nanopartículas de cobre comerciales que fue lo utilizado para los ensayos de citotoxicidad.

Tabla 14. Concentración de cobre liberada por 20 [mg] de nanopartículas de cobre comerciales.

Cantidad de NPCu [mg]		Cobre liberado [mg/L]	
		24 horas	96 horas
NPCu	20	3,39	5,82

En la Tabla 14 se puede observar que el cobre liberado por 20 [mg] de nanopartículas comerciales es muy superior que el cobre liberado por la mayoría de las muestras de alginato y polipropileno estudiadas tanto en 24 como en 96 horas. Se realizó una comparación sobre la capacidad de liberación de iones cobre de estos compósitos, por gramo de nanopartículas de cobre, en la siguiente sección.

IV.13 Comparación de resultados de citotoxicidad de las matrices poliméricas de Polipropileno y Alginato según los estudios de liberación de iones cobre

A lo largo de este trabajo, se han evaluado la citotoxicidad de las matrices poliméricas de polipropileno y alginato reportando además un ensayo sobre la liberación de cobre en cada caso. En esta sección, se realizará una comparación de la citotoxicidad de ambas matrices comparando su capacidad de liberación de iones cobre, por gramo de nanopartículas de cobre, con respecto a la lixiviación de las nanopartículas comerciales. Esta comparación se puede observar en el Gráfico 24.

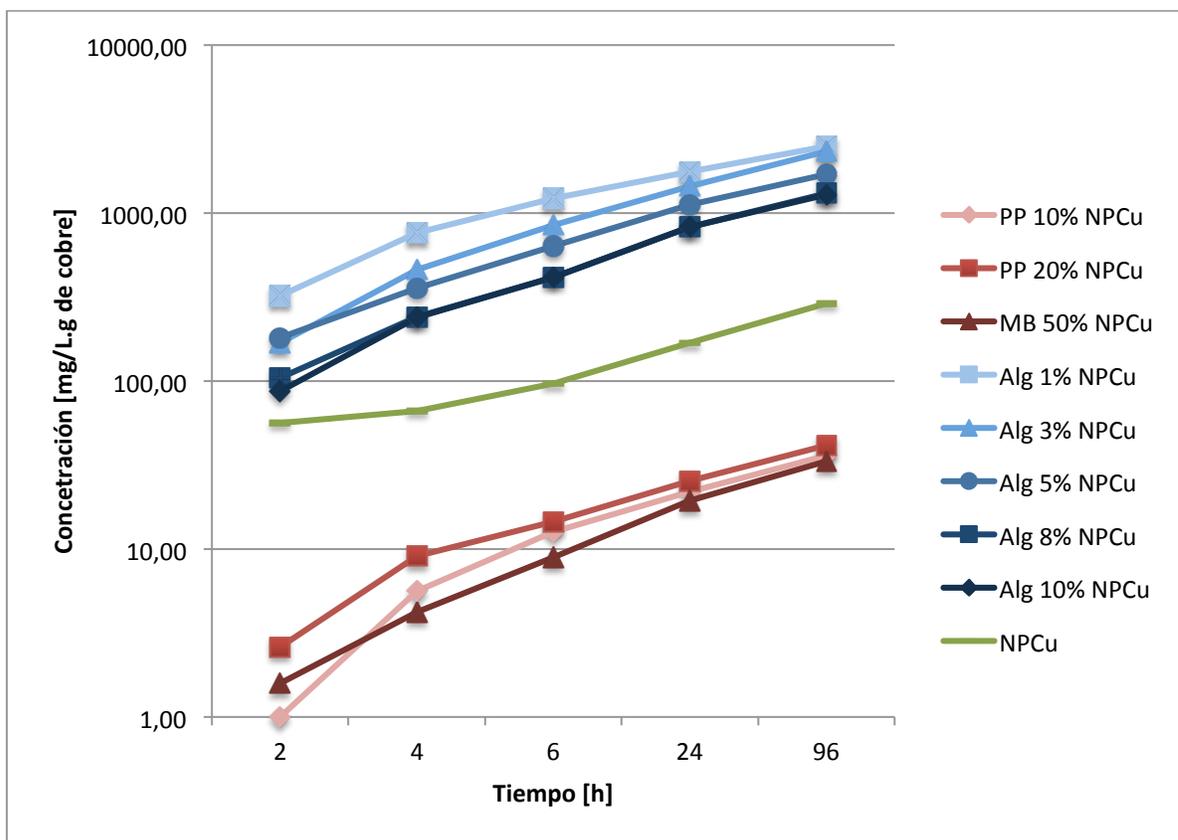


Gráfico 24. Comparación de la liberación de iones cobre de los compósitos poliméricos evaluados.

En el Gráfico 24 se observa que, como se había dicho anteriormente, los compósitos de alginato, por gramo de nanopartículas de cobre en el compósito, tienen una capacidad de liberación de iones cobre mayor que los compósitos de polipropileno. A modo de comparación, el compósito de alginato con 10% de NPCu libera una cantidad de iones cobre aproximadamente 30 veces mayor que el compósito de polipropileno con 10% de NPCu en el mismo periodo de tiempo. En cuanto a las nanopartículas de cobre comerciales, estas liberan, por gramo, una cantidad de iones cobre aproximadamente 10 veces mayor que los compósitos de polipropileno. Estos resultados confirman una liberación controlada de iones cobre para la matriz de polipropileno.

Por otro lado se puede observar que, los compósitos de alginato, por gramo de nanopartículas de cobre en el compósito, tienen una capacidad de liberación de iones cobre aproximadamente 5 veces mayor que las nanopartículas de cobre comerciales. Este resultado no es el esperado ya que se esperaba que la capacidad de liberación de iones cobre del alginato fuera menor o, al menos equivalente a la de las nanopartículas

de cobre comerciales. Se investigará más adelante si el cambio en el pH de la solución con alginato está afectando el resultado.

La capacidad de liberación de iones cobre del compósito depende de las características de la matriz polimérica. Los compósitos de polipropileno liberan el cobre que contienen de una forma bastante más controlada que los compósitos de alginato ya que este último tiene las propiedades de un hidrogel y, por ende, una mayor capacidad de liberación de iones. La liberación del cobre es tan controlada en el polipropileno que hasta compósitos con 20% de NPCu no son tóxicos para las células en 96 horas. En el alginato, en cambio, se observa toxicidad relativa al cobre a partir de los compósitos con 3% de NPCu en 24 horas.

Capítulo V Conclusiones

En conclusión se puede decir que se implementaron las metodologías que permitieran evaluar la citotoxicidad de compósitos poliméricos con nanopartículas de cobre y se estudió su citotoxicidad en líneas celulares normales y tumorales.

En este trabajo se observó una baja viabilidad celular de los cultivos en presencia de los compósitos de polipropileno no modificados debida a que la adherencia celular en el polipropileno no es buena, sin embargo mejora bastante al modificar su superficie. El polybond, que es un polipropileno injertado con anhídrido maleico, resultó ser una buena alternativa para problemas de adherencia celular, por ser más polar que el polipropileno, pero se trata de un polímero muy quebradizo por lo que se descarta esta alternativa.

Pese a los problemas de adherencia, se concluye que los compósitos de polipropileno con nanopartículas de cobre no son tóxicos, en las condiciones evaluadas, ni para células de corteza cerebral de ratón normal (CNh) ni para células cancerígenas de tiroides (UCHT1) en 24 horas. Se ha comprobado, en estudios anteriores, que este compósito es bactericida en las mismas condiciones por lo que podría ser utilizado en aplicaciones médicas como implantes. En un tiempo de exposición superior (96 horas), la muestra con mayor concentración de nanopartículas de cobre (masterbatch con 50% de NPCu) se vuelve tóxica para ambas líneas celulares.

De los resultados de citotoxicidad de los compósitos de alginato se puede concluir que la matriz de alginato es citotóxica por diversas razones donde la principal es que la solución de alginato se preparó con agua destilada, que tiene una gran diferencia de osmolaridad con el medio de cultivo, en el cual se realizan los ensayos de citotoxicidad. Al preparar la solución de alginato con PBS, que tiene una menor diferencia de osmolaridad con el medio de cultivo que el agua destilada, la viabilidad celular aumenta considerablemente. Los compósitos de alginato con nanopartículas de cobre son tóxicos, a partir del 3% de NPCu, tanto para células de corteza cerebral de ratón normal (CNh) como para células cancerígenas de tiroides (UCHT1). La toxicidad de estos

compósitos se debe a su mayor capacidad de liberación de los iones cobre, al tener característica de hidrogel.

Gracias al estudio realizado para las matrices poliméricas de polipropileno y alginato, se concluye que el intervalo a partir del cual la concentración de cobre liberado, en agua, es tóxica para las células es [0,76; 1,1] [mg/L].

Finalmente, los compósitos de polipropileno, por su capacidad de liberación controlada de iones y, por lo tanto, su propiedad bactericida y su baja citotoxicidad, se proyectan como una buena alternativa para el desarrollo de implantes bactericidas. Se recomienda, sin embargo, la realización de estudios de citotoxicidad de estos compósitos sobre líneas celulares humanas, por ejemplo osteoblastos, para ratificar los resultados obtenidos para las líneas de celulares de ratón estudiadas.

Capítulo VI Bibliografía

- [1] Hechavarria J., Suarez R., Armaignac G., Del Pozo C. (2001) *Infección nosocomial en la unidad de cuidados intensivos*. Recuperado el 30 de Mayo de 2012 de http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol5_4_01/san02401.pdf
- [2] Brenener P., Nercelles P. et. al. (2003) *Costo de las infecciones intrahospitalarias en hospitales chilenos de alta y mediana complejidad*. Rev Chil Infect, 20, 283-290.
- [3] Von Eiff C., Jansen B., Kohnen W., & Becker K. (2005) *Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis*. Drugs, 65(2), 179–214.
- [4] Darouiche R. (2004) *Treatment of infections associated with surgical implants*. The New England journal of medicine, 350, 1422-1429.
- [5] Palza H., Gutiérrez S., Delgado K., Quijada R., Salazar O., Fuenzalida V., et al. (2010). *Toward Taylor-Made Biocide Materials Based on Poly(propylene)/Copper Nanoparticles*. Macromolecular Rapid Communications, 31, 563-567.
- [6] Muñoz-Bonilla A., & Fernández-García M. (2012) *Polymeric materials with antimicrobial activity*. Progress in Polymer Science, 37 (2), 281–339.
- [7] Centro Español de Información del Cobre (s.f.) *El Mundo del Cobre*. Recuperado el 8 de Octubre de 2012 de, <http://www.infocobre.org.es/aplicaciones-cobre.html>.
- [8] COCHILCO (2012) *Informe Tendencias Mercado del Cobre Mayo-Julio de 2012*
- [9] Inta, Pro Cobre, Innova Chile CORFO *Cobre: Salud, Medio Ambiente y Nuevas Tecnologías*.
- [10] PRO COBRE (2011) *Cobre bactericida*. Recuperado el 10 de Mayo de 2012 de <http://www.procobre.org/es/biblioteca/?did=21>

- [11] Borkow G., & Gabbay J. (2005) *Copper as a biocidal tool*. Current medicinal chemistry, 12(18), 2163–2175.
- [12] Innova Chile CORFO (2010) *Cobre Antimicrobiano: científicamente comprobado*.
- [13] Sahoo S. K., Parveen S., & Panda J. J. (2007) *The present and future of nanotechnology in human health care*. Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine, 3(1), 20–31.
- [14] Xia, X., Xie, C., Cai, S., Yang, Z., & Yang, X. (2006). *Corrosion characteristics of copper microparticles and copper nanoparticles in distilled water*. Corrosion Science, 48(12), 3924–3932.
- [15] Velilla, T. (2007). *Estudio de la polimerización de etileno y propileno en sistemas homogéneos y heterogéneos: correlación estado del catalizador– propiedades de los polímeros formados*. Tesis para doctorado, FCFM, Universidad de Chile, Departamento de Ciencias de la Ingeniería, Mención Química, Santiago.
- [16] Kamrupi IR, Dolui SK. *Synthesis of copper–polystyrene nanocomposite particles using water in supercritical carbon dioxide medium and its antimicrobial activity*. J Appl Polym Sci 2011;120:1027–33.
- [17] Maier C., Calafut T. (1998). *Polypropylene: The Definitive User's Guide and Databook*, Plastics Design Library.
- [18] Mark, J. E. (1999). *Polymer Data Handbook*. Oxford: Oxford University Press, Inc.
- [19] Goh, C. H., Wan, P., Heng, S., & Chan, L. W. (2012). *Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications*. Carbohydrate Polymers, 88(1), 1–12.
- [20] Parente, E., Clementi, F., Moresi, M. (1998). *Alginate production by Azotobacter vinelandii DSM576 in batch fermentation*. Ind. Microbiol. Biotechnol, 20, 171-176.

- [21] Calvo M, *Alginato*. Recuperado el 12 de Noviembre del 2012 de <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/azucares/alginato.html>
- [22] Gisley M, G. (2009). *Intercambio Iónico en Geles de Alginato de Calcio*. Protocolo de Tesis, Instituto Tecnológico de Durango, Departamentos de Ingenierías Química y Bioquímica, México.
- [23] Rozenberg B., Tenne R. (2008). *Polymer-assisted fabrication of nanoparticles and nanocomposites*. *Progress in Polymer Science*, 33, 40-112.
- [24] Benavides, S., Villalobos-carvajal, R., & Reyes, J. E. (2012). *Physical , mechanical and antibacterial properties of alginate film : Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration*. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 232–239
- [25] Freshney R. *Culture of Animal Cells*, Fifth Edition. Wiley.
- [26] Cabané P., Díaz J., Rojas J., Maluenda F., Rencoret G., Saud K., et al. (2007) *Optimización de cultivos de hepatocitos humanos para estudios de citotoxicidad*. *Revista Chilena de Cirugía*, 59, 116-121.
- [27] Monteiro-Riviere, N. a, Inman, a O., & Zhang, L. W. (2009). *Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line*. *Toxicology and applied pharmacology*, 234(2), 222–35.
- [28] Castro de Pardo, C. (2006). *Pruebas de tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones ó sustancias, utilizando la prueba del MTT*. *Materiales*, 1–11.
- [29] O'Connell T., Roach T. (2002). *Live/Dead Assay for Cell Viability AfCS Procedure Protocol PP0000002300*.
- [30] Li Y., Ho J., Ping C. (2010) *Antibacterial efficacy and cytotoxicity studies of copper (II) and titanium (IV) substituted hydroxyapatite nanoparticles*. *Materials Science and Engineering C*, 30, 1137–1144.

- [31] Valodkar M., Singh P. et. Al. (2012) *Cytotoxicity evaluation and antimicrobial studies of starch capped water soluble copper nanoparticles*. Journal of Hazardous Materials, 201– 202, 244– 249.
- [32] Gérard C., Bordeleau L., Barralet J., & Doillon C. (2010) *The stimulation of angiogenesis and collagen deposition by copper*. Biomaterials, 31, 824-31.
- [33] Hu G. (1998) *Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture*. Journal of cellular biochemistry, 69, 326-3.
- [34] Chemtura Corporation (2007) *Polybond 3200 TDS*, Technical Information.
- [35] Aron & Aron, *Capítulo 11: Comparación de varios tratamientos o grupos*. Recuperado el 20 de Marzo del 2013 de <http://dta.usalca.cl/estadistica/ejercicios/interpretar/Metodos/anova.pdf>
- [36] Sabadías A. (1995) *Estadística descriptiva e inferencial*. COMPOBELL, S.L. Murcia.

Capítulo VII Anexos

VII.1 Análisis Estadístico de Tukey

La prueba de Tukey es un análisis estadístico de comparación múltiple. Este tipo de análisis se realiza, generalmente, después de un análisis de la varianza (ANOVA, Analysis of Variance en ingles) por lo que se explicará esto en un primer lugar.

VII.1.1 ANOVA

ANOVA es el procedimiento para determinar si existen diferencias significativas entre varias poblaciones o grupos. Generalizando, el análisis consiste en lo siguiente [35]: Se tienen k muestras aleatorias independientes como se muestra en la Figura 29.

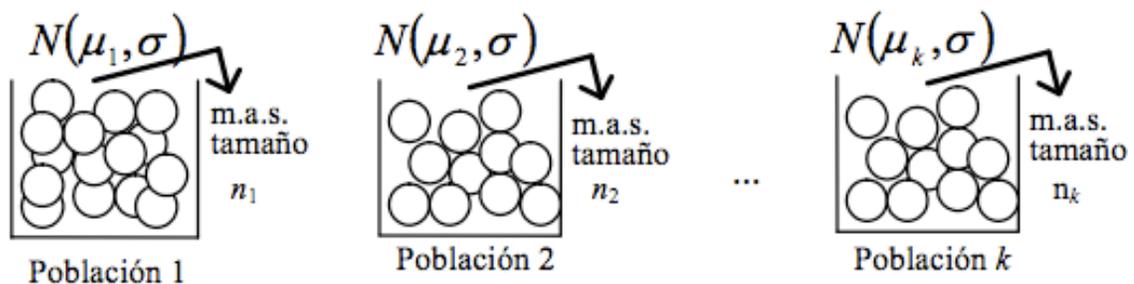


Figura 29. Diagrama general de un experimento a analizar por ANOVA [35].

Donde μ_i representa la media del grupo i y σ corresponde a la desviación estandar, que en este ejemplo es constante pero no tiene porque serlo en todos los casos. Entonces se tiene que docimar la siguiente hipótesis:

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$$

H_1 : al menos dos medias no son iguales

Estas hipótesis se pueden graficar como se muestra en la Figura 30.

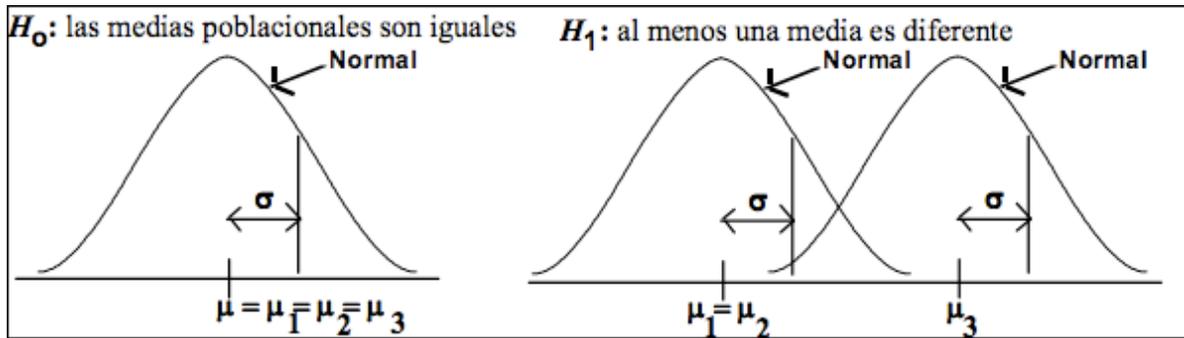


Figura 30. Diagrama de las hipótesis del análisis de la varianza [35].

Si se ha rechazado la hipótesis nula de igualdad de medias (H_0), esto supone que existe al menos una diferencia entre las medias. El problema es que no se sabe cuántas diferencias existen, ni entre que medias. Para esto se establecen pruebas de comparación múltiple como el análisis de Tukey que se utilizó en este trabajo y que se describirá en mayor detalle en esta sección.

VII.1.2 Prueba de Tukey

La prueba de Tukey o prueba de diferencia significativa honesta (DSH) de Tukey es un test que se suele utilizar cuando se quiere comparar cada grupo con los demás y el número de grupos es alto.

La forma habitual de presentar los resultados de un test de hipótesis como el test de ANOVA es a través del p-valor. El p-valor es el nivel de significación menor que llevaría al rechazo de la hipótesis nula H_0 .

El método de Tukey se explica a continuación [36]:

- Se estiman las diferencias entre las medias de los grupos, comparando todos los grupos entre sí.
- Se define el rango “estudentizado” de Tukey r_T como la siguiente función:

$$r_T = T(\alpha, k, G_L)$$

Donde α es el nivel de significación escogido, k el número de repeticiones y G_L el número de grados de libertad de la media cuadrática del error. Los valores del rango estudentizado de Tukey (r_T) vienen tabulados en la Tabla de Tukey.

- Se compara el valor absoluto de las diferencias entre las medias con el rango menos significativo de Tukey, R_T , que es el producto de r_T por la desviación típica de las diferencias, σ_T :

$$R_T = r_T \sigma_T$$

Donde $\sigma_T = \sqrt{\frac{MCE}{m}}$, con MCE la media cuadrática entre los grupos.

- Si el valor absoluto de una de las diferencias es mayor que R_T , se consideran las medias correspondientes significativamente diferentes.

Para este trabajo se utilizó un programa en Excel que, al entregarle las medias de los grupos a comparar, la desviación estándar de cada grupo y el número de repeticiones, devuelve directamente el p-valor correspondiente a la comparación de dos grupos (en el caso de que haya diferencias significativas entre las medias de ambos grupos). Si no se encuentran diferencias significativas entre dos grupos, el programa entrega la sigla n.s.

VII.2 Citotoxicidad de compósitos de polipropileno con nanopartículas de cobre por ensayo MTT: Estudio sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh)

La tabla de resultados de la citotoxicidad de compósitos de polipropileno con nanopartículas de cobre sobre células CNh después de 24 horas de incubación se muestra a continuación.

Tabla 15. Viabilidad Celular del polipropileno con nanopartículas de cobre.

Control	Muestras			
	PP blanco	PP 10% NPCu	PP 20% NPCu	MB 50% NPCu
100,0%	56,6%	55,6%	56,7%	90,30%

En la siguiente tabla se muestran los resultados de citotoxicidad para las muestras de polipropileno injertado con anhídrido maleico (polybond).

Tabla 16. Viabilidad Celular de los Polímeros Polybond y Masterbatch 50% NPCu.

	Control	Muestras	
		Polybond	Masterbatch 50% NPCu
Control	100%		
PP Puro		93,8%	90,3%
PP Funcionalizado		95,4%	92,8%
PP Gelatina		94,4%	91,9%
PP Funcionalizado /Gelatina		97,1%	93,3%

Las tablas de resultados de los ensayos de adherencia que se realizaron al polímero de polipropileno se muestran a continuación.

Tabla 17. Viabilidad celular de la placa donde se retiró el polímero.

Control	Placa Polímero retirado		
	PP blanco	PP 10% NPCu	PP 20% NPCu
100,0%	52,7%	51,2%	50,3%

Tabla 18. Viabilidad celular de la placa con las muestras poliméricas.

Control	Placa con Polímero		
	PP blanco	PP 10% NPCu	PP 20% NPCu
100,0%	30,9%	30,4%	29,3%

VII.3 Adherencia celular en compósitos poliméricos de polipropileno

La tabla de resultados de los ensayos de citotoxicidad para los compósitos de polipropileno con superficie modificada (funcionalizados y/o con gelatina) se muestra a continuación.

Tabla 19. Viabilidad Celular de los Polímeros modificados para mejorar la adherencia celular.

	Control	Muestras			
		PP blanco	PP 10% NPCu	PP 20% NPCu	MB 50% NPCu
Control	100,0%				
PP Puro		56,6%	55,6%	56,7%	90,3%
PP Funcionalizado		64,0%	68,0%	74,7%	92,80%
PP con Gelatina		61,6%	62,0%	64,2%	91,90%
PP Funcionalizado con Gelatina		69,80%	66,80%	79,20%	93,30%

Las tablas de resultados de los ensayos de adherencia que se realizaron al polímero de polipropileno modificado se muestran a continuación.

Tabla 20. Viabilidad celular de la placa donde se retiró el polímero modificado.

	Control	Placa Polímero retirado		
		PP blanco	PP 10% NPCu	PP 20% NPCu
Control	100,0%			
PP Funcionalizado		51,8%	49,3%	51,0%
PP con Gelatina		52,6%	51,2%	51,7%

Tabla 21. Viabilidad celular de la placa con las muestras poliméricas modificadas.

	Control	Placa con Polímero		
		PP blanco	PP 10% NPCu	PP 20% NPCu
Control	100,0%			
PP Funcionalizado		36,8%	35,4%	36,8%
PP con Gelatina		34,5%	41,1%	40,1%

VII.4 Citotoxicidad del polipropileno con nanopartículas de cobre en un periodo de tiempo más prolongado (96 horas): Estudio sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh)

La tabla de resultados de la citotoxicidad de compósitos de polipropileno con nanopartículas de cobre sobre células CNh después de 96 horas de incubación se muestra a continuación.

Tabla 22. Viabilidad celular del polipropileno con NPCu en 96 horas.

Control	Muestras 96 horas			
	PP blanco	PP 10% NPCu	PP 20% NPCu	MB 50% NPCu
100,0%	79,0%	75,2%	73,0%	68,3%

VII.5 Citotoxicidad de polipropileno con nanopartículas de cobre: Estudio sobre células tumorales endocrinas de la tiroides (UCHT1)

La tabla de resultados de la citotoxicidad de compósitos de polipropileno con nanopartículas de cobre sobre células UCHT1 después de 24 horas de incubación se muestra a continuación.

Tabla 23. Viabilidad Celular del polipropileno con nanopartículas de cobre para células UCHT1.

Control	Muestras			
	PP blanco	PP 10% NPCu	PP 20% NPCu	MB 50% NPCu
100,0%	70,3%	70,1%	76,8%	94,0%

VII.6 Citotoxicidad del polipropileno con nanopartículas de cobre en un periodo de tiempo más prolongado (96 horas): Estudio sobre células tumorales endocrinas de la tiroides (UCHT1)

La tabla de resultados de la citotoxicidad de compósitos de polipropileno con nanopartículas de cobre sobre células UCHT1 después de 96 horas de incubación se muestra a continuación.

Tabla 24. Viabilidad celular del polipropileno con NPCu en 96 horas para células UCHT1.

Control	Muestras 96 horas			
	PP blanco	PP 10% NPCu	PP 20% NPCu	MB 50% NPCu
100,0%	60,4%	56,1%	65,0%	69,7%

VII.7 Citotoxicidad del polipropileno con nanopartículas de cobre: Ensayo de liberación de iones cobre.

La tabla de resultados del ensayo de liberación de iones cobre de los compósitos de polipropileno con nanopartículas de cobre se muestra a continuación.

Tabla 25. Lixiviación de iones cobre de los compósitos de polipropileno con 10% y 20% de NPCu y polybond con 50% de NPCu en [mg/L.cm²].

Horas	PP 10% NPCu	PP 20% NPCu	MB 50% NPCu
0	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,14	0,32
4	0,14	0,49	0,84
6	0,32	0,78	1,78
24	0,55	1,37	3,88
96	0,90	2,25	6,69

VII.8 Citotoxicidad de compósitos de alginato con nanopartículas de cobre: Estudio sobre células de corteza cerebral de ratón normal (CNh)

La tabla de resultados de la citotoxicidad de compósitos de alginato con nanopartículas de cobre sobre células CNh después de 24 horas de incubación se muestra a continuación.

Tabla 26. Viabilidad Celular del alginato con nanopartículas de cobre para células CNh.

Control	Muestras					
	Alginato blanco	Alginato 1% NPCu	Alginato 3% NPCu	Alginato 5% NPCu	Alginato 8% NPCu	Alginato 10% NPCu
100,0%	40,9%	35,3%	21,3%	2,9%	2,5%	1,9%

VII.9 Citotoxicidad de compósitos de alginato con nanopartículas de cobre: Estudio sobre células tumorales endocrinas de la tiroides (UCHT1)

La tabla de resultados de la citotoxicidad de compósitos de alginato con nanopartículas de cobre sobre células cancerígenas UCHT1 después de 24 horas de incubación se muestra a continuación.

Tabla 27. Viabilidad Celular del alginato con nanopartículas de cobre para células UCHT1.

Control	Muestras					
	Alginato blanco	Alginato 1% NPCu	Alginato 3% NPCu	Alginato 5% NPCu	Alginato 8% NPCu	Alginato 10% NPCu
100,0%	52,0%	37,5%	15,3%	5,5%	4,1%	2,1%

VII.10 Citotoxicidad del alginato con nanopartículas de cobre: Ensayo de liberación de iones cobre.

La tabla de resultados del ensayo de liberación de iones cobre de los compósitos de alginato con nanopartículas de cobre, por gramo de alginato (20 esferas), se muestra a continuación.

Tabla 28. Lixiviación de iones cobre de los compósitos de alginato con 1%, 3%, 5%, 8% y 10% de NPCu en [mg/L.g].

Horas	Alg 1% NPCu	Alg 3% NPCu	Alg 5% NPCu	Alg 8% NPCu	Alg 10% NPCu
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	1,54	2,42	4,35	4,00	4,00
4	3,65	6,63	8,56	9,26	11,0
6	5,89	11,4	15,2	15,9	19,1
24	8,46	20,0	26,8	31,7	38,1
96	11,96	32,8	40,8	50,3	59,1

